

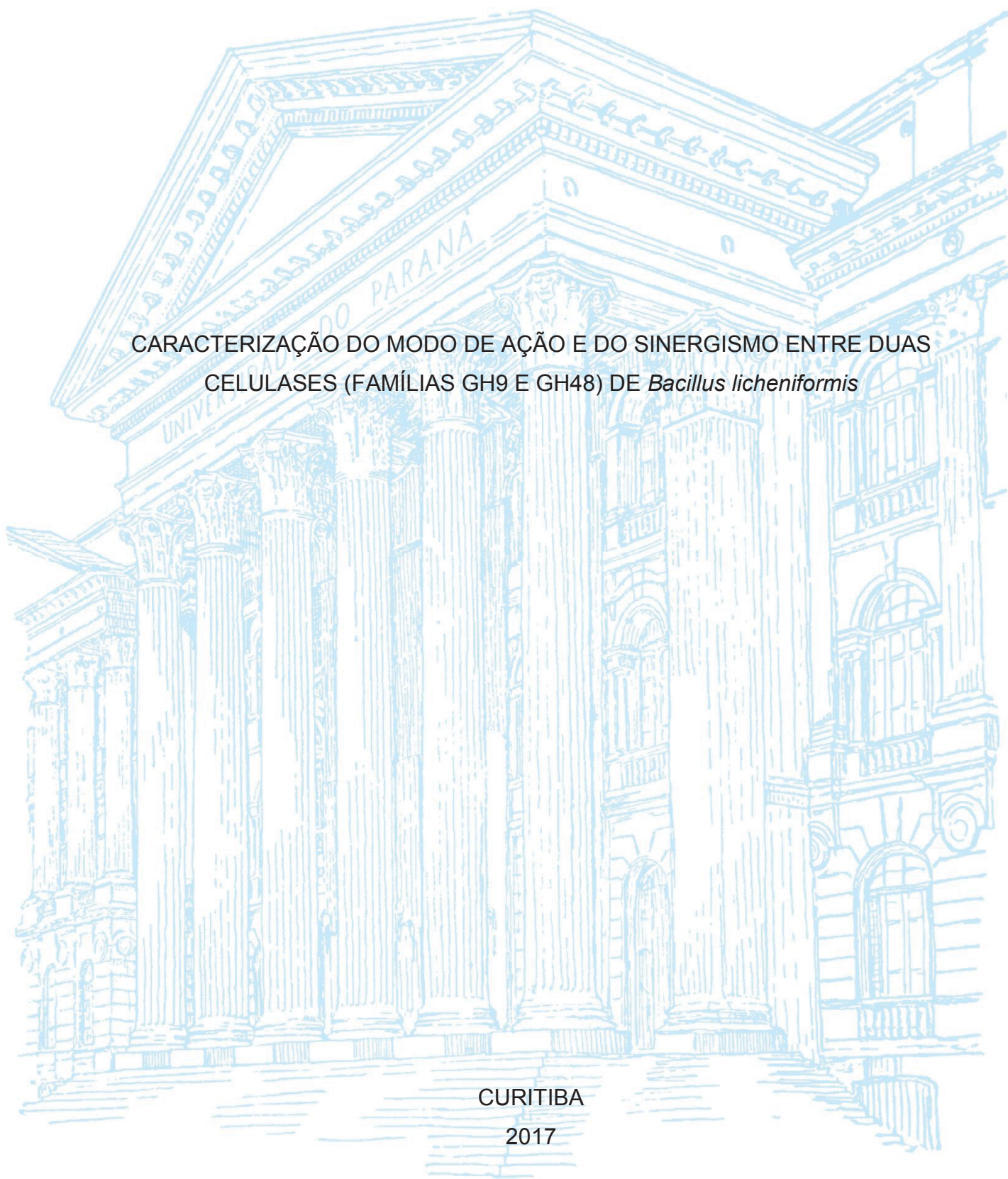
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATEUS BARBIAN URIO

CARACTERIZAÇÃO DO MODO DE AÇÃO E DO SINERGISMO ENTRE DUAS
CELULASES (FAMÍLIAS GH9 E GH48) DE *Bacillus licheniformis*

CURITIBA

2017



MATEUS BARBIAN URIO

CARACTERIZAÇÃO DO MODO DE AÇÃO E DO SINERGISMO ENTRE DUAS
CELULASES (FAMÍLIAS GH9 E GH48) DE *Bacillus licheniformis*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioenergia, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioenergia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

CURITIBA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

U76 Urio, Mateus Barbian
Caracterização do modo de ação e do sinergismo entre duas
celulases (famílias GH9 e GH48) de *Bacillus licheniformis* /
Mateus Barbian Urio – Curitiba, 2017.
71f.

Orientador: Luiz Pereira Ramos
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioenergia.

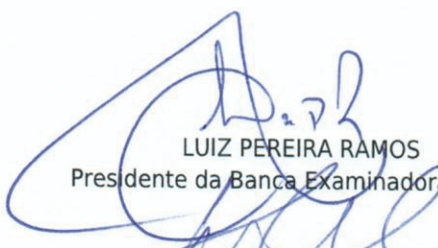
1. *Bacillus licheniformis*. 2. Celulases. 3. Sinergismo. 4. Hidrólise enzimática. I. Ramos, Luiz Pereira. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 620

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOENERGIA - UEL - UEM - UEPG - UNICENTRO - UNIOESTE - UFPR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MATEUS BARBIAN URIO**, intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO DO MODO DE AÇÃO E DO SINERGISMO ENTRE DUAS CELULASES (FAMÍLIAS GH9 E GH48) DE *Bacillus licheniformis*"**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação.

Palotina, 24 de Fevereiro de 2017.



LUIZ PEREIRA RAMOS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



MARCOS HENRIQUE LUCIANO SILVEIRA
Avaliador Externo (CTC)



VIVIANE ISABEL SERPA MULLER
Avaliador Externo (NLA)

Dedico este trabalho aos meus pais Valdecir e Ivone

AGRADECIMENTOS

Devo meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para que esta caminhada chegasse ao seu ponto final. Por isto, eu aqui vos agradeço.

Aos meus pais Valdecir e Ivone pelo amor, apoio e por não medirem esforços na busca pela minha educação e qualificação profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos e também ao Prof. Dr. Igor Polikarpov pelas oportunidades ofertadas, pelo compartilhamento de conhecimento e pela confiança em mim depositada.

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao Programa de Pós Graduação em Bioenergia e a todos os professores envolvidos em minha formação.

Ao doutorando Evandro Ares de Araújo pela amizade e grande colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Me. Bruno Vanelli e Dr. Marcos Silveira pela intensa parceria e pelas contribuições com minha formação científica.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) da Universidade Federal do Paraná em especial aos meus amigos Alexis, Arion, Daiane, Débora, Douglas, Esther, Giselli, Gustavo, Kanda, Laís, Paola e Vinícius.

Aos amigos do Departamento de Química e das outras universidades paranaenses participantes do Programa de Pós-Graduação em Bioenergia.

Aos colegas do grupo de Biotecnologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo pela receptividade, troca de conhecimentos e amizades construídas, em especial ao meu caro Danilo.

A todos os meus demais amigos e familiares que torceram por mim e me incentivaram durante toda esta jornada.

Às entidades financiadoras deste trabalho em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e aos demais órgãos que suportam os laboratórios em que tive o prazer de trabalhar.

A todos, o meu MUITO OBRIGADO!

*“Qualquer ser humano, em qualquer parte do mundo,
irá florescer em cem talentos e capacidades inesperadas,
simplesmente por lhe ser dada a oportunidade de o fazer.”*

Doris Lessing

RESUMO

A celulose é o polímero natural mais abundante do planeta e a hidrólise enzimática deste material apresenta grande potencial para a produção de combustíveis e insumos químicos de forma sustentável e renovável. Todavia, o custo dos complexos enzimáticos comerciais aplicados e os elevados tempos reacionais que este sistema exige ainda correspondem aos principais gargalos desse processo. Neste cenário, esforços ainda têm sido despendidos na busca de enzimas potencialmente degradadoras da celulose até então não identificadas e nos estudos de seus respectivos modos de ação. Sendo assim, o presente trabalho objetivou a caracterização dos perfis hidrolíticos de duas celulasas das Famílias GH9 e GH48 expressas por *Bacillus licheniformis* (B/Cel9A e B/Cel48A, respectivamente) quanto aos seus perfis de liberação de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) e insolúveis (AR_{Insol}) durante a hidrólise de celulose inchada com ácido fosfórico (PASC) e celulose bacteriana produzida por *Acetobacter xylinum*. Inicialmente, os substratos celulósicos foram caracterizados de modo que os perfis hidrolíticos pudessem ser correlacionados com suas características estruturais. Dois modelos de celulose foram obtidos. Enquanto a PASC apresentou baixo grau de polimerização (237 resíduos de anidroglicose) e ausência de fases cristalinas, um alto índice de cristalinidade (64,5%) e elevado grau de polimerização (2.259 resíduos de anidroglicose) foi observado para a celulose bacteriana. Em ambos os substratos, a B/Cel48A apresentou-se como uma exoglucanase típica, liberando majoritariamente AR_{Sol} ao passo que B/Cel9A apresentou tanto liberação de AR_{Sol} quanto de AR_{Insol}, comprovando sua atividade endoglucanásica processiva. As diferenças estruturais entre os substratos empregados permitiram a obtenção de diferentes perfis hidrolíticos para B/Cel9A. Quando aplicada sobre PASC, uma maior liberação de AR_{Sol} foi observada, mesmo em baixas cargas enzimáticas, pois o substrato já apresenta em maior quantidade terminais de cadeia disponíveis para a sua ação processiva. Por outro lado, quando empregada sobre celulose bacteriana, a B/Cel9A demonstrou uma maior produção de AR_{Insol} em baixas cargas enzimáticas e em tempos reacionais de até 6 horas. Além disto, quando avaliada a hidrólise de celulose bacteriana ao longo do tempo empregando 0,25 µmol L⁻¹ dessa celulase, foi observada uma liberação inicial equimolar de AR_{Insol} e AR_{Sol}, ao passo que a proporção de AR_{Sol} aumentou ao longo do tempo. A ocorrência de um efeito sinérgico entre as enzimas foi evidenciada apenas em celulose bacteriana devido à disponibilidade limitada de terminais de cadeia para a ação exoglucanásica de B/Cel48A e ao impedimento estrutural causado pela alta cristalinidade desse substrato. Nesse caso, a liberação de açúcares solúveis pela mistura de B/Cel9A e B/Cel48A chegou a se apresentar sete vezes maior do que a soma das atuações individuais de cada enzima neste substrato.

Palavras-chave: *Bacillus licheniformis*, celulasas, sinergismo, hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Cellulose is the most abundant biopolymer on earth and the hydrolysis of this material presents great potential for the sustainable and renewable production of fuels and chemicals. However, the high cost of the commercial enzymatic complexes used for this purpose and the high reaction times are still the main technological barriers of this process. In this way, the scientific community still searching for new potential enzymes able of hydrolyzing cellulose and the hydrolytic characterization of these enzymes is essential for these studies. In this scenario, the goal of this work was to characterize the hydrolytic profiles of two *Bacillus licheniformis* cellulases of Family GH9 and Family GH48 (*B/Cel9A* and *B/Cel48A*, respectively) in relation to their capacity of release soluble (AR_{Sol}) and insoluble (AR_{Insol}) reducing sugars during hydrolysis of phosphoric acid swollen cellulose (PASC) and bacterial cellulose (produced by *Acetobacter xylinum*). At first, the cellulosic substrates were characterized in order to enable a better correlation of their structural features with the hydrolytic profiles. Two distinct cellulosic structures were obtained. PASC presented low degree of polymerization (237 anhydroglucose residues) and no crystalline phases. By contrast, a high crystallinity index (64.5%) and a high degree of polymerization (2,259 anhydroglucose residues) were observed for bacterial cellulose. In both substrates, *B/Cel48A* presented as a typical exoglucanase, releasing mostly AR_{Sol} . On the other hand, *B/Cel9A* presented both release of AR_{Sol} and AR_{Insol} , confirming its processive endoglucanase activity. The difference of the substrates structures results in different hydrolytic profiles for *B/Cel9A*. When PASC was used as substrate (low degree of polymerization) there are already a lot of chain ends available for a processive action, and in these cases a higher release of AR_{Sol} was observed, even at low enzymatic loadings. By contrast, when used bacterial cellulose as substrate (high degree of polymerization), *B/Cel9A* showed a higher production of AR_{Insol} at low enzymatic loads and in the first 6 hours of reaction. Moreover, when studied the time course hydrolysis of $0.25 \mu\text{mol L}^{-1}$ of *B/Cel9A* against bacterial cellulose, an initial equimolar release of AR_{Insol} and AR_{Sol} was observed, while the ratio of AR_{Sol} increased over time. A synergistic effect was observed only on bacterial cellulose due to the crystalline structural impediments and the limited availability of chain ends for the exoglucanase action of *B/Cel48A*. The release of soluble sugars by the *B/Cel9A* and *B/Cel48A* mixture was 7-fold higher than the sum of the individual sugars released by the individual action of each enzyme in this substrate.

Keywords: *Bacillus licheniformis*, cellulases, synergism, enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA CELULOSE: (A) CADEIA LINEAR DE CELULOSE E (B) ARRANJO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRA E INTERCADEIAS.	18
FIGURA 2 – ESTRUTURAS ALOMÓRFICAS DE CELULOSE I _α (A) E I _β (B) COM A IDENTIFICAÇÃO DOS PLANOS DE DIFRAÇÃO CORRESPONDENTES.....	20
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS POSSÍVEIS PROCESSOS DE INTERCONVERSÃO ENTRE AS DIFERENTES ESTRUTURAS CRISTALINAS DA CELULOSE.	21
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATUAÇÃO DE UM SISTEMA DE CELULASES LIVRES SOBRE A CELULOSE.....	24
FIGURA 5 – MECANISMOS DE (A) RETENÇÃO E (B) INVERSÃO DE CONFIGURAÇÃO DE GLICOSIL HIDROLASES.....	25
FIGURA 6 – ESTRUTURAS TÍPICAS DE DOMÍNIOS CATALÍTICOS DE: (A) UMA ENDOGLUCANASES E DE (B) UMA EXOGLUCANASE.	26
FIGURA 7 – ESTRUTURA DE MÓDULOS DE LIGAÇÃO À CARBOIDRATOS (CBM) DE FAMÍLIAS: (A) CBM DE FAMÍLIA 4 COMPLEXADO COM CELOPENTAOSE E (B) CBM DE FAMÍLIA 17 COMPLEXADO COM CELOTETRAOSE.	27
FIGURA 8 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DE AVICEL, CELULOSE BACTERIANA E CELULOSE INCHADA EM ÁCIDO FOSFÓRICO (PASC).	40
FIGURA 9 – PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CELULOSE PER-CARBAMILADAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.	43
FIGURA 10 - ELETROFORESE EM SDS-PAGE DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE (A) <i>B/Cel9A</i> E (B) <i>B/Cel48A</i> : (M) PADRÕES DE MASSA MOLECULAR; (1) FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO; (2) FRAÇÃO ELUÍDA DA COLUNA DE AFINIDADE; (3) FRAÇÃO SOBRENADANTE DO LISADO; (4) FRAÇÃO OBTIDA APÓS CLIVAGEM COM TEV-PROTEASE E (5) CELULASE PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO.	45
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELATIVA (%) DE <i>B/Cel9A</i> (1,2 μmol L ⁻¹) E <i>B/Cel48A</i> (10,0 μmol L ⁻¹) EM UM pH INTERMEDIÁRIO (5,5) COM RELAÇÃO AO pH ÓTIMO DE CADA ENZIMA DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (0,1%) POR 1 h A 60 °C.....	47
FIGURA 12 - TERMOESTABILIDADE DE <i>B/Cel9A</i> (1,2 μmol L ⁻¹) E <i>B/Cel48A</i> (10,0 μmol L ⁻¹) EXPRESSAS EM ATIVIDADE DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%) POR 1 h EM TAMPÃO CITRATO-FOSFATO (pH 5,5) APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE INCUBAÇÃO RELACIONADAS À ATIVIDADE, EM CADA TEMPERATURA, DAS CELULASES NÃO SUBMETIDAS À INCUBAÇÃO.	48

FIGURA 13 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (A) <i>B/Cel9A</i> E (B) <i>B/Cel48A</i> DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%) POR 15 min.....	49
FIGURA 14 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE (15 min) DE PASC (1%) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>B/Cel9A</i> , QUANDO MISTURADAS A 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	51
FIGURA 15 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (AR _{Tot}) E (B) AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS (AR _{Sol}) DURANTE A HIDRÓLISE (15 min) DE PASC (1%) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>B/Cel9A</i> , QUANDO MISTURADAS A 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	52
FIGURA 16 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) TOTAIS (AR _{Tot}), SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) AO LONGO DO TEMPO DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%), EMPREGANDO (A) 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel9A</i> , (B) 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i> E (C) UM MISTURA DE 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel9A</i> + 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	53
FIGURA 17 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (A) <i>B/Cel9A</i> E (B) <i>B/Cel48A</i>	55
FIGURA 18 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>B/Cel9A</i> SOBRE 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	56
FIGURA 19 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (AR _{Tot}) E (B) AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS (AR _{Sol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>B/Cel9A</i> SOBRE 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	57
FIGURA 20 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) TOTAIS (AR _{Tot}), SOLÚVEIS (AR _{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR _{Insol}) AO LONGO DO TEMPO DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) EMPREGANDO: (A) 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel9A</i> ; (B) 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i> E (C) UMA MISTURA DE 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel9A</i> + 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	59
FIGURA 21 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AR _{Tot} E (B) AR _{Sol} DURANTE A HIDRÓLISE (60 min) DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR UMA MISTURA DE 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel9A</i> + 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE <i>B/Cel48A</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR _{Insol}	açúcares redutores insolúveis
AR _{Sol}	açúcares redutores solúveis
AR _{Tot}	açúcares redutores totais
B/Cel48A	celulase de família GH48 de <i>Bacillus licheniformis</i>
B/Cel9A	celulase de família GH9 de <i>Bacillus licheniformis</i>
CB	celulose bacteriana
CBHs	celobiohidrolases
CBM	módulos de ligação a carboidratos (do inglês <i>carbohydrate binding modules</i>)
CMC	carboximetilcelulose
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
EqGlc	equivalentes de glucose
GP	grau de polimerização
GP _M	grau de polimerização associado à massa molar média
GP _N	grau de polimerização associado à massa numérica média
ICr	índice de cristalinidade
LIC	sistema de clonagem independente de ligase
LPMO	monooxigenases polissacarolíticas (do inglês <i>lytic polysaccharide monooxygenases</i>)
MM _M	média ponderal das massas molares
MM _N	média numérica das massas molares
PASC	celulose inchada com ácido fosfórico (do inglês <i>phosphoric acid swollen cellulose</i>)
PD	polidispersividade
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila (do inglês <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TEV	do inglês <i>Tobacco Etch Virus</i>
THF	tetraidrofurano
u.m.a.	unidades de massa atômica
ϵ	absortividade molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CELULOSE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL.....	17
2.2	HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE	22
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS CELULASES	28
2.4	GLICOSIL HIDROLASES DE FAMÍLIAS 9 E 48 EXPRESSAS POR <i>Bacillus licheniformis</i>	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	PRODUÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS.....	33
4.1.1	Celulose inchada em ácido fosfórico (PASC)	33
4.1.2	Celulose bacteriana	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS	33
4.2.1	Difratometria de Raios-X.....	33
4.2.2	Cromatografia de exclusão por tamanho	34
4.3	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>B/Cel9A</i> E <i>B/Cel48A</i>	36
4.4	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	37
4.5	QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE PROTEÍNAS	37
4.6	ENSAIOS HIDROLÍTICOS	37
4.6.1	Definição do pH de trabalho	38
4.6.2	Ensaio de termoestabilidade.....	38
4.6.3	Perfis de liberação de açúcares solúveis e insolúveis e determinação do grau de sinergismo	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS	40
5.1.1	Difratometria de Raios-X.....	40
5.1.2	Cromatografia de exclusão por tamanho	42
5.2	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE <i>B/Cel9A</i> E <i>B/Cel48A</i>	44
5.3	DEFINIÇÃO DO pH E TEMPERATURA DE TRABALHO	46

5.4	AVALIAÇÃO DOS PERFIS HIDROLÍTICOS E GRAU DE SINERGIA EMPREGANDO PASC COMO SUBSTRATO.....	49
5.5	AVALIAÇÃO DOS PERFIS HIDROLÍTICOS E GRAU DE SINERGIA EMPREGANDO CELULOSE BACTERIANA COMO SUBSTRATO.....	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	TRABALHOS CIENTÍFIOS PUBLICADOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A celulose, principal constituinte da parede celular vegetal, representa a maior fonte natural de carboidratos do mundo e se apresenta como uma matéria-prima promissora não só para a produção de energia, mas também de insumos químicos e materiais de forma renovável e sustentável.

A hidrólise (ou sacarificação) deste polímero com vista à produção de carboidratos solúveis passíveis de serem convertidos a outros produtos de interesse vem sendo estudada há mais de trinta anos (SPANIO et al., 1976). Este processo baseia-se a quebra das ligações glicosídicas entre os resíduos de glucose que compõem a celulose. Esta etapa pode ser realizada tanto por via química como por via enzimática (BALAT et al., 2008). Processos enzimáticos apresentam-se mais atrativos devido à alta seletividade, baixa demanda de energia, não geração de inibidores de fermentação, dispensa de materiais resistentes à corrosão e diminuição de riscos operacionais (BALAT, 2011). Por outro lado, o elevado tempo necessário à conversão enzimática da celulose, assim como os altos custos dos complexos celulolíticos empregados, apresentam-se como principais entraves tecnológicos deste processo (LIU et al., 2016).

Neste sentido, o aumento da viabilidade econômica deste processo depende, dentre outras necessidades, da redução dos custos dos complexos enzimáticos empregados como também da otimização da composição destes complexos de modo a reduzir os tempos reacionais. Dentre estes esforços, estão contemplados os estudos voltados à busca por novas enzimas potencialmente degradadoras da celulose (CHERRY e FIDANTSEF, 2003; KLEIN-MARCUSCHAMER et al., 2012).

Embora a hidrólise ainda seja um gargalo tecnológico e econômico, a identificação de novas enzimas propiciaram nas últimas décadas uma redução drástica nos custos de produção e um aumento bastante expressivo nos rendimentos de hidrólise obtidos (SAINI et al., 2015). Um claro exemplo deste sucesso é a identificação e incorporação em sistemas celulolíticos comerciais de uma nova classe de proteínas auxiliares denominadas monooxigenases polissacarolíticas (LPMO, do inglês *lytic polysaccharide monooxygenases*), que revolucionaram o conceito de hidrólise enzimática da biomassa que se tinha até então (HARRIS et al., 2010; HARRIS et al., 2014).

A busca por novas enzimas para este processo é baseada na análise de genomas de micro-organismos degradadores de celulose, o que, por sua vez, propicia a identificação de genes que codificam as enzimas de interesse. Estes, então, são clonados e a proteína de interesse é produzida em sistemas de expressão heteróloga (tais como *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris*). A partir daí, estudos estruturais e bioquímicos são realizados para mensurar o real potencial desta enzima em ser incorporada em complexos celulolíticos comerciais (FERRER et al., 2015). Neste contexto, o presente trabalho visa caracterizar os perfis hidrolíticos de duas celulasas das famílias GH9 e GH48 de *Bacillus licheniformis* (B/Cel9A e B/Cel48A, respectivamente) quanto aos seus modos de ação e sinergismo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O suprimento mundial de energia, produtos químicos e materiais ainda é baseado na indústria petroquímica e seus derivados. A instabilidade do preço do petróleo, o constante aumento da demanda por estes produtos e a preocupação ambiental pelo uso extensivo de fontes fósseis incentiva a busca por estratégias de cunho sustentável, voltadas à exploração de fontes renováveis. Nesse sentido, a biomassa lignocelulósica é apontada como uma promissora matéria-prima para a produção de biocombustíveis e insumos para a indústria (PAYNE et al., 2015).

Materiais lignocelulósicos são assim definidos por apresentarem celulose, hemiceluloses (ambos polissacarídeos) e lignina (composto polifenólico) em sua estrutura (SADDLER, 1992). Dentre estes componentes, a celulose representa a maior fração mássica e tem recebido especial atenção, pois, a partir da hidrólise completa desse material, obtém-se uma solução rica em glucose que pode ser facilmente convertida via processos fermentativos em polióis (MARQUES et al., 2016), solventes e biocombustíveis (BALAT, 2011), ácidos orgânicos (DENG et al., 2016) dentre outros produtos, alguns já bem estabelecidos tecnologicamente, como é o caso da produção de etanol via *Saccharomyces cerevisiae*. Neste sentido, aspectos químicos e estruturais deste biopolímero encontram-se discutidos nas próximas seções, assim como detalhes relacionados à sua bioconversão.

2.1 CELULOSE: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTRUTURAL

Como observado na Figura 1A, a celulose é um homopolissacarídeo formado por ligações glicosídicas β do tipo (1 \rightarrow 4) entre resíduos de anidrogucose, exclusivamente. Portanto, a celulose é classificada como uma β -(1 \rightarrow 4)-D-glucana. Devido à conformação em cadeira 4C_1 do anel piranosídico da D-glucose e à orientação equatorial da hidroxila do anômero β , este biopolímero apresenta-se de forma linear, sendo que a celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil-D-glucopiranoose) é a sua unidade conformacional (RAMOS, 2003).

A quantidade de unidades de anidrogucose que formam uma cadeia pode variar de acordo com a fonte e localização na macroestrutura da parede celular (tratando-se de vegetais), podendo ser reduzida quando esse material é submetido a diferentes tratamentos (FENGEL e WEGENER, 1989). Assim como para outros

polímeros, esta característica é denominada grau de polimerização (GP). O GP de celulose bacteriana, de algodão e de outras fibras vegetais varia em torno de 1.000 a 10.000 unidades de anidroglicose (KLEMM et al., 2005). Processos de polpação *kraft* em média reduzem o GP da celulose para 1.000 a 1.300 unidades, enquanto que processos baseados em hidrólise ácida para a produção de celulose microcristalina (Avicel) podem atingir valores cerca 250 e 300 unidades (FAN et al., 1987; FENGEL e WEGENER, 1989).

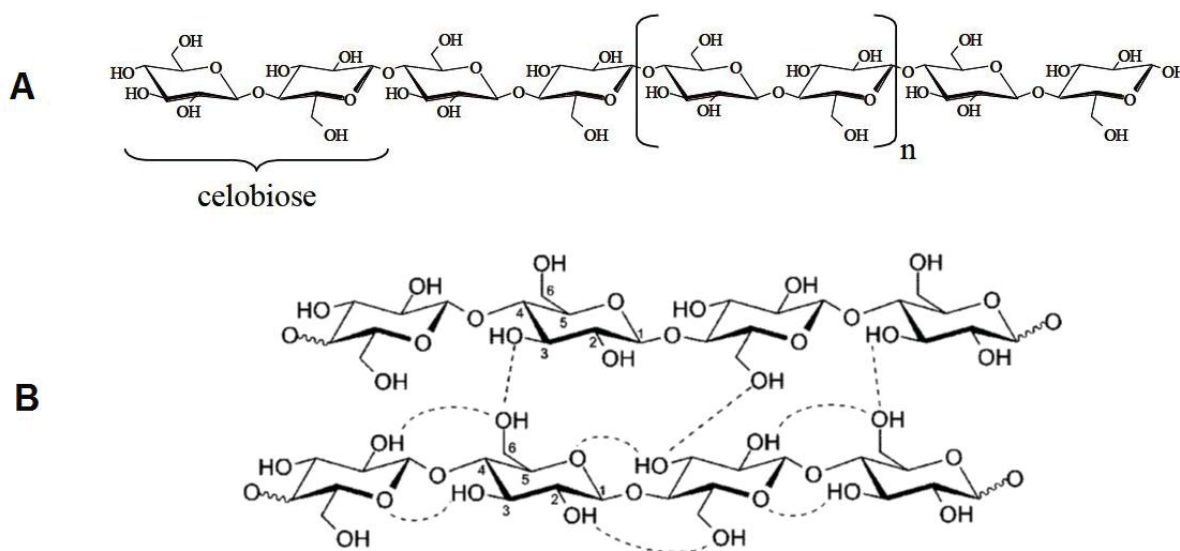


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DA CELULOSE: (A) CADEIA LINEAR DE CELULOSE E (B) ARRANJO DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO INTRA E INTERCADEIAS.

FONTE: Pinkert et al. (2009) e Pitarelo (2013).

Independentemente do seu tamanho, a celulose apresenta duas extremidades ou terminais de cadeia, uma redutora e outra não redutora. O terminal redutor tem esta denominação porque é suscetível ao fenômeno da mutarrotação, mediante o qual ocorre a abertura e fechamento do anel hemiacetálico em meio aquoso. O carbono 1 deste terminal é denominado anomérico, assim como a hidroxila a ele ligada, que pode assumir orientação axial ou equatorial no anel piranosídico em cadeia 4C_1 , definindo assim a ocorrência dos anômeros α e β , respectivamente (CASTRO e PEREIRA JR, 2010). Já no lado oposto da cadeia está o terminal não redutor, que corresponde a uma hidroxila secundária livre ligada ao carbono 4 do anel

piranosídico que, no interior da cadeia, está ligada covalentemente ao carbono anomérico do resíduo adjacente. O poder redutor mencionado acima decorre do grupamento aldeídico da forma aberta gerada pelo fenômeno da mutarrotação e esse pode ser medido tanto em carboidratos hidrossolúveis quanto em polissacarídeos insolúveis em água como a celulose. Tais medidas são usualmente realizadas pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), originalmente desenvolvido por Miller (1959).

O arranjo de ligações de hidrogênio intra e intercadeias representados na Figura 1B conferem à celulose regiões de elevada organização denominadas cristalinas, as quais são altamente recalcitrantes e insolúveis em água. Contudo, existem regiões onde há um menor grau de associação (denominadas amorfas) e, conseqüentemente, menor cristalinidade. Estas são mais suscetíveis à hidrólise enzimática (BIDLACK et al., 1992; VIKARI et al., 2012).

A respeito da estrutura cristalina da celulose, é importante mencionar que esse biopolímero apresenta polimorfismo e suas sete diferentes estruturas cristalinas são denominadas celulose I_α , I_β , II, III_I, III_{II}, IV_I e IV_{II}. Apenas as formas alomórficas I_α e I_β são de ocorrência natural e, portanto, são denominadas celulosas nativas (OGEDA e PETRI, 2010). Estas duas formas cristalinas da celulose apresentam cadeias em disposição paralela (PAYNE et al., 2015) e podem ser encontradas em uma mesma fonte, sendo a sua proporção variável conforme a origem do material celulósico (ATALLA e VAN DER HART, 1984; KLEMM et al., 2005). Celuloses do tipo I_α são predominantemente produzidas por algas e bactérias, enquanto que, em vegetais superiores, algodão e gramíneas, predomina a presença de celulose I_β (NISHIYAMA et al., 2002). As diferenças estruturais de celulose I_α e I_β estão representadas na Figura 2, assim como a identificação dos planos cristalográficos correspondentes.

Como observado, a celulose I_α (de arranjo triclinico) apresenta apenas uma cadeia em sua cela unitária e o cristal consiste em camadas paralelas idênticas. Por sua vez, o cristal da cellulose I_β (de arranjo monoclinico) é formado por duas diferentes camadas alternadas, denominadas camadas de centro e de origem. Cabe ressaltar que, em ambas as formas I_α e I_β , as ligações de hidrogênio intermoleculares são realizadas apenas entre cadeias laterais de uma mesma camada de empilhamento (PAYNE et al., 2015). Também são demonstrados na Figura 2 os índices de Miller, que correspondem às coordenadas dos vetores associados aos planos

cristalográficos (h,k,l) que, por sua vez, estão relacionados às estruturas supramoleculares das celulosas I_α e I_β . A identificação dos picos das reflexões correspondentes por difratometria de raios-X permite a determinação dos índices de cristalinidade, uma medida quantitativa associada à organização estrutural deste biopolímero (PARK et al., 2010).

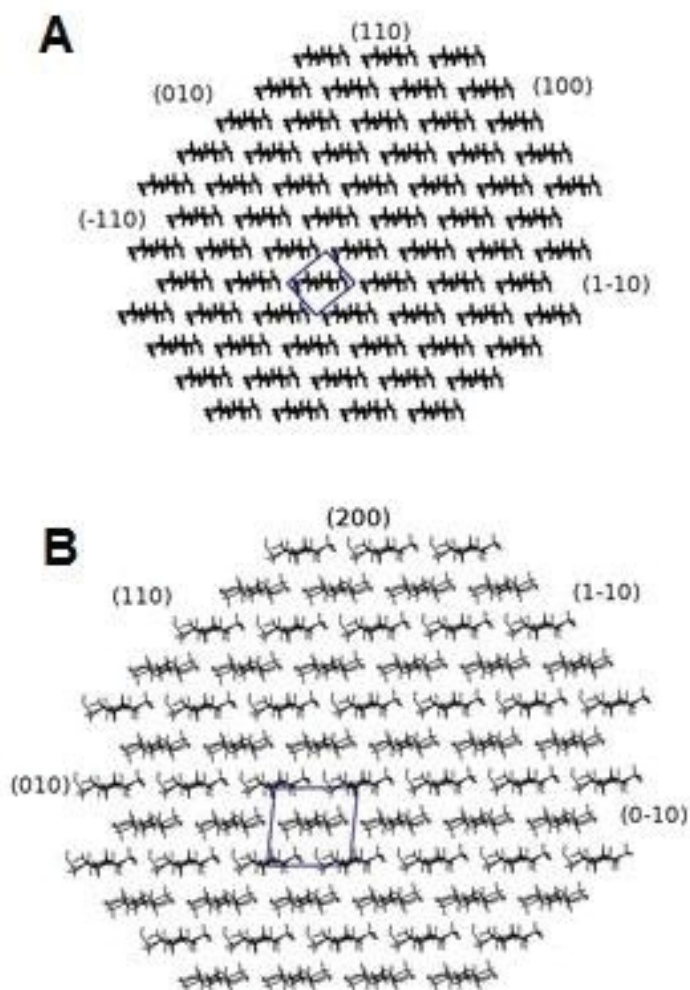


FIGURA 2 – ESTRUTURAS ALOMÓRFICAS DE CELULOSE I_α (A) E I_β (B) COM A IDENTIFICAÇÃO DOS PLANOS DE DIFRAÇÃO CORRESPONDENTES.
FONTE: Maurer et al. (2013).

As demais formas cristalinas da celulose são obtidas a partir do tratamento da celulose I e os possíveis processos de interconversão entre estas estruturas estão apresentados na Figura 3.

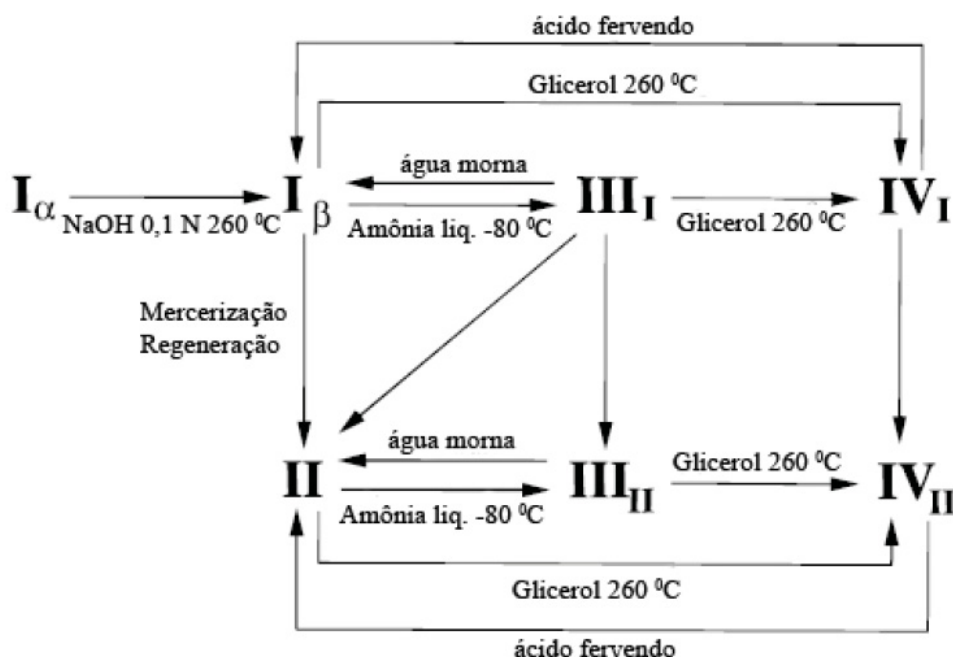


FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS POSSÍVEIS PROCESSOS DE INTERCONVERSÃO ENTRE AS DIFERENTES ESTRUTURAS CRISTALINAS DA CELULOSE.

FONTE: Kroon-Batenburg et al. (1996), traduzido por Gurgel (2007).

A celulose II, que é obtida por mercerização ou regeneração da celulose I, apresenta cadeias com disposição antiparalela, cuja estrutura apresenta a maior estabilidade entre as demais formas alomórficas (KLEMM et al., 2005). O tratamento da celulose com amônia líquida leva à obtenção de celulose III, podendo esta apresentar dois diferentes arranjos: celulose III_I (quando oriunda da celulose I) e celulose III_{II} (quando oriunda da celulose II) (WADA et al., 2006). Por fim, o tratamento de celulose I ou III_I e II ou III_{II} com glicerol sob aquecimento proporciona a obtenção de celulose IV_I e IV_{II} , respectivamente. Cabe ressaltar que, como observado na Figura 3, algumas destas mudanças de estruturas cristalinas são reversíveis mediante tratamentos com água morna e ácido sob fervura. Porém, uma vez modificada a celulose I a celulose II, este processo é irreversível (KROON-BATENBURG et al., 1996).

Visto a complexidade estrutural da celulose, serão discutidos na seção subsequente os mecanismos enzimáticos capazes de convertê-la a um xarope rico em açúcares fermentescíveis.

2.2 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA CELULOSE

O isolamento e a identificação de ascomicetos mesofílicos filamentosos, responsáveis pela degradação de equipamentos militares americanos em ilhas do Pacífico Sul durante a Segunda Guerra Mundial, representam um marco histórico nos estudos de produção de enzimas extracelulares capazes de degradar a celulose. Inicialmente, pesquisas lideradas por Elwyn T. Reese e Marry Mandels, nos laboratórios de pesquisas militares de Natick (Massachusetts, EUA), assumiram o papel de compreender e propor um mecanismo de controle a esse processo degradativo. Entretanto, uma vez identificado o grande potencial deste fenômeno para novas aplicações industriais baseadas em materiais celulósicos, o foco das pesquisas passou a priorizar a busca por mecanismos capazes de aumentar os níveis de expressão destas enzimas (BISCHOF et al., 2016). Tão grandes foram as contribuições científicas de Elwyn T. Reese que cepas anteriormente denominadas como *Trichoderma viride* foram renomeadas à *Trichoderma reesei*, em sua homenagem, durante a reclassificação desta espécie (SIMMONS, 1977).

Até o início dos anos 50, estudos eram baseados no pressuposto de que apenas uma enzima era responsável pela degradação da celulose. A primeira proposta de mecanismo para os complexos enzimáticos, denominada C₁-C_x, foi apresentada por Reese (1956) e complementada por Mandels e Reese (1964). Nesta proposta, um componente “C₁” atuaria (não necessariamente por um mecanismo hidrolítico) inicialmente sobre a celulose nativa tornando-a reativa e suscetível à ação de um segundo componente, denominado C_x. O componente C_x, por sua vez, seria capaz de hidrolisar a celulose à celobiose que, por fim, seria convertida à glucose pela ação também hidrolítica das β-glucosidades. Décadas se passaram e novos modelos foram elaborados para refinar as ideias inicialmente propostas por estes pesquisadores. Atualmente, embora já se tenha alcançado um alto grau de compreensão sobre a dinâmica deste fenômeno, avanços ainda continuam surpreendendo a comunidade científica pela descoberta de novas enzimas com funções até então desconhecidas.

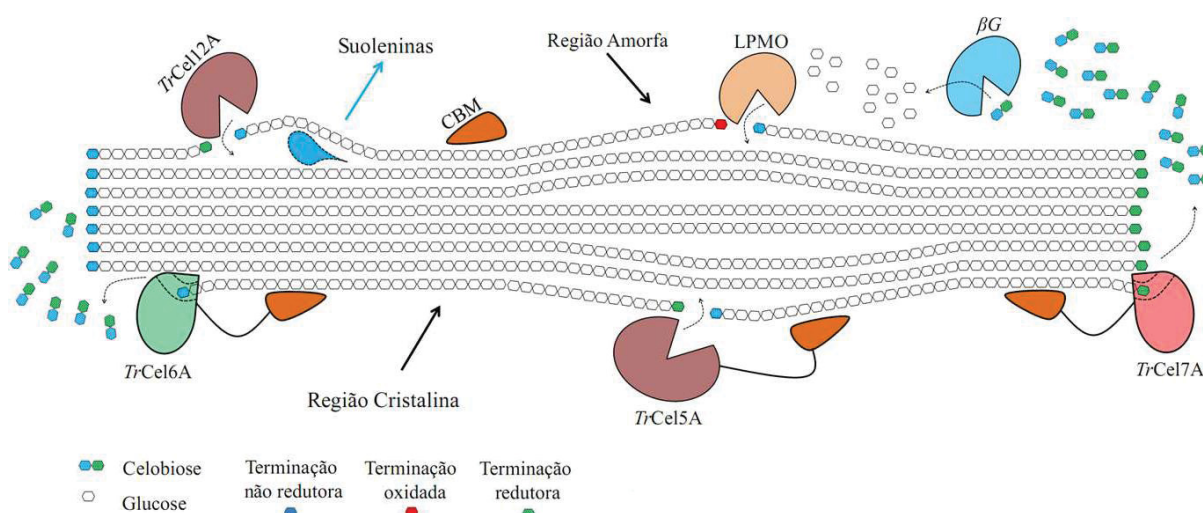
Enzimas capazes de realizar a hidrólise de ligações glicosídicas são denominadas glicosil hidrolases e estas podem receber uma nomenclatura mais específica de acordo com o substrato sob o qual atuam. Celulases, por exemplo, são capazes de catalisar a hidrólise ou sacarificação da celulose. Glicosil hidrolases,

assim como outras enzimas ativas em carboidratos, são catalogadas no Banco de Dados de Enzimas Ativas em Carboidratos (CAZy) de acordo com semelhanças entre as sequências de aminoácidos que as compõem, como também entre estruturas secundárias e terciárias que conferem especificidades ao seu modo de ação (ROSSETO, 2011). Atualmente, esse banco de dados conta com 135 famílias de glicosil hidrolases.

De modo a facilitar o diálogo entre os diferentes grupos de pesquisa que se dedicavam ao tema, Henrissat et al. (1998) propôs uma nomenclatura padrão para identificar as diferentes glicosil hidrolases. Tal identificação é composta por três letras associadas ao substrato de preferência, seguidas de um número que representa a família de glicosil hidrolases à qual ela pertence e, por fim, uma letra que corresponde à ordem na qual diferentes enzimas de um mesmo organismo foram descobertas. Por exemplo, Cel6A e Cel6B de *T. reesei* são, respectivamente, a primeira e a segunda celulasas da Família 6 identificadas em *T. reesei*. Ainda, é consenso identificar o organismo que expressa enzima; portanto, essas celulasas devem ser identificadas por *TrCel6A* e *TrCel6B*, respectivamente.

Como observado na Figura 4, a hidrólise enzimática da celulose é hoje atribuída à ação sinérgica de três principais classes de glicosil hidrolases, assim como pela contribuição de proteínas auxiliares não-hidrolíticas, tais como suoleninas e monooxigenases polissacarolíticas (LPMOs). Endo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases, tais como *TrCel5A* e *TrCel12A*, atuam em regiões de menor cristalinidade produzindo novos terminais redutores e não redutores, reduzindo assim o grau de polimerização das cadeias de celulose. Por sua vez, as celobiohidrolases I e II, tais como *TrCel7A* e *TrCel6A*, classificadas como exo- β -(1 \rightarrow 4)-glucanases, atuam processivamente nos terminais redutores e não-redutores da cadeia de celulose, respectivamente, solubilizando-a majoritariamente à celobiose. A atuação processiva de celobiohidrolases é caracterizada pela ação de ciclos catalíticos sequenciais em uma única cadeia de celulose. Tal mecanismo apresenta benefícios cinéticos, uma vez que não envolvem fenômenos de dissociação, difusão e reassociação entre enzima e substrato em ciclos catalíticos consecutivos (CRUYS-BAGGER et al., 2013). Algumas endoglucanases também possuem a capacidade de atuar processivamente e, portanto, são denominadas endoglucanases processivas, como é o caso de algumas glicosil hidrolases da Família 9 (SAKON et al., 1997; KOSTYLEV e WILSON, 2014). Finalmente, as β -(1 \rightarrow 4)-glucosidases convertem os substratos solúveis liberados

pelas exoglucanases à glucose (WOOD e MCCRAE, 1979; SILVEIRA et al., 2014; PAYNE et al., 2015). Endo e exoglucanases são denominadas celulases verdadeiras pois, independentemente do produto liberado pelas suas respectivas ações, atuam sobre a superfície da fibra de celulose, diferentemente das β -glucosidases que atuam sobre produtos solúveis da reação (SUKHARNIKOV et al., 2012).



TrCel12A, endoglucanases da Família 12 expressas por *T. reesei*; **TrCel6A**, exoglucanases da Família 6 expressas por *T. reesei*; **TrCel5A**, endoglucanases da Família 5 expressas por *T. reesei*; **TrCel7A**, exoglucanases da Família 7 expressas por *T. reesei*; **CBM**, módulo de ligação a carboidratos; **LPMO**, monooxigenases polissacarolíticas; **β G**, β -glucosidases.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATUAÇÃO DE UM SISTEMA DE CELULASES LIVRES SOBRE A CELULOSE.
FONTE: Silveira (2014).

Glicosil hidrolases apresentam dois principais mecanismos de reação (Figura 5), que dependem fundamentalmente de dois resíduos de aminoácidos: um doador de próton e um nucleófilo. A distância entre estes dois resíduos no interior do sítio catalítico determinará se a reação ocorrerá de forma a reter (Figura 5A) ou inverter (Figura 5B) a configuração anomérica. No mecanismo de retenção, os resíduos de aminoácidos encontram-se mais próximos (cerca de 5,5 Å). Já no mecanismo de inversão, os resíduos de aminoácidos encontram-se mais distantes (cerca de 10 Å), permitindo assim acomodar uma molécula de água entre o nucleófilo e o açúcar (DAVIES e HENRISSAT, 1995).

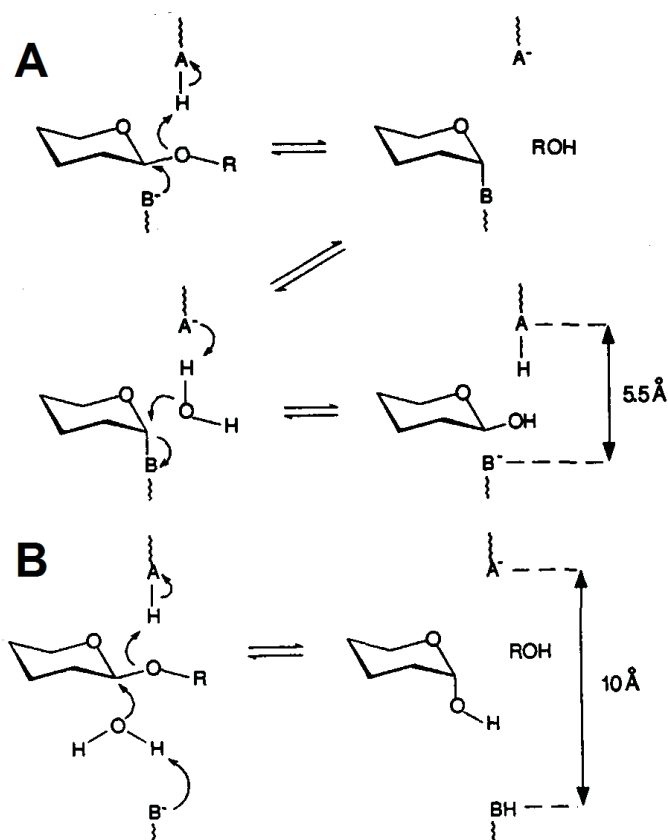


FIGURA 5 – MECANISMOS DE (A) RETENÇÃO E (B) INVERSÃO DE CONFIGURAÇÃO DE GLICOSIL HIDROLASES.

FONTE: Davies e Henrissat (1995).

Embora diferentes glicosil hidrolases possam apresentar o mesmo mecanismo de reação, a individualidade do modo de ação de cada uma é determinada, dentre outros fatores, pela sua estrutura, em especial a do sítio catalítico. Na Figura 6 são apresentados dois modelos típicos de estruturas dos módulos catalíticos de uma endoglucanase (Figura 6A) e uma exoglucanase (Figura 6B).

Como endoglucanases possuem o sítio catalítico em formato de fenda, estas são capazes de hidrolisar ligações glicosídicas no meio das cadeias de celulose, principalmente em regiões pouco cristalinas. Por outro lado exoglucanases apresentam seu sítio catalítico na forma de túnel, no qual a cadeia de celulose deve ser introduzida para que a ação catalítica seja exercida, limitando assim a sua atuação às extremidades da cadeia (DAVIES e HENRISSAT, 1995).

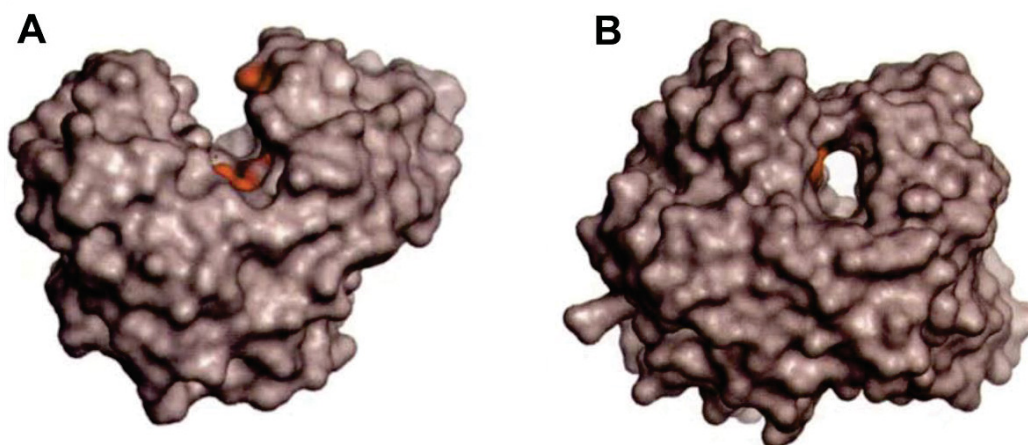


FIGURA 6 – ESTRUTURAS TÍPICAS DE DOMÍNIOS CATALÍTICOS DE: (A) UMA ENDOGLUCANASES E DE (B) UMA EXOGLUCANASE.
FONTE: Davies e Henrissat (1995).

Uma vez que os produtos de reação, celobiose e glucose, apresentam semelhanças estruturais com o substrato (celulose), estes promovem uma inibição competitiva pelo sítio catalítico da enzima. Tal fenômeno é denominado inibição pelo acúmulo de produtos, também conhecido como inibição retroativa. Celobiose e glucose são relacionados na literatura como fortes inibidores de celulases e o seu acúmulo no meio de reação caracteriza um dos principais fatores responsáveis pela diminuição da velocidade da hidrólise ao longo do tempo (ANDRIĆ et al., 2010; TEUGJAS e VÄLJAMÄE, 2013).

A especificidade do modo de ação de cada glicosil hidrolase dentro de um sistema celulolítico também acarreta um interessante efeito denominado sinergismo. A ação sinérgica entre as enzimas faz com que a liberação de açúcares pela ação de um complexo celulásico seja maior do que as ações individuais de duas ou mais enzimas fora do complexo. Isto ocorre porque a ação entre elas é complementar, já que endoglucanases criam novos pontos de ação para exoglucanases, ao passo que β -glucosidases reduzem a inibição retroativa de exoglucanases pelo consumo de celobiose (WALKER e WILSON, 1991).

Sabe-se que para as celulases catalisarem a reação de hidrólise é necessário se estabelecer um contato físico direto entre as microfibrilas e o complexo enzimático (adsorção). Assim, a taxa de hidrólise é profundamente afetada pelas características estruturais do substrato, especialmente a área superficial e a cristalinidade (FAN et al., 1980; SADDLER et al., 1982; GHARPURAY et al., 1983). Para tanto, algumas

celulases apresentam em sua estrutura um módulo de ligação a carboidratos (CBM, do inglês *carbohydrate-binding module*) conectado ao módulo catalítico através de um *linker*. Estudos indicam que a remoção dos CBMs de celulases contribui drasticamente para a redução da atividade enzimática sobre a celulose insolúvel, ao passo que esta permanece praticamente inalterada sobre celulose solúvel (IRWIN et al., 1993). Duas diferentes estruturas de CBMs são apresentadas na Figura 7, destacando os resíduos aromáticos (em roxo) responsáveis pela interação com a celulose.

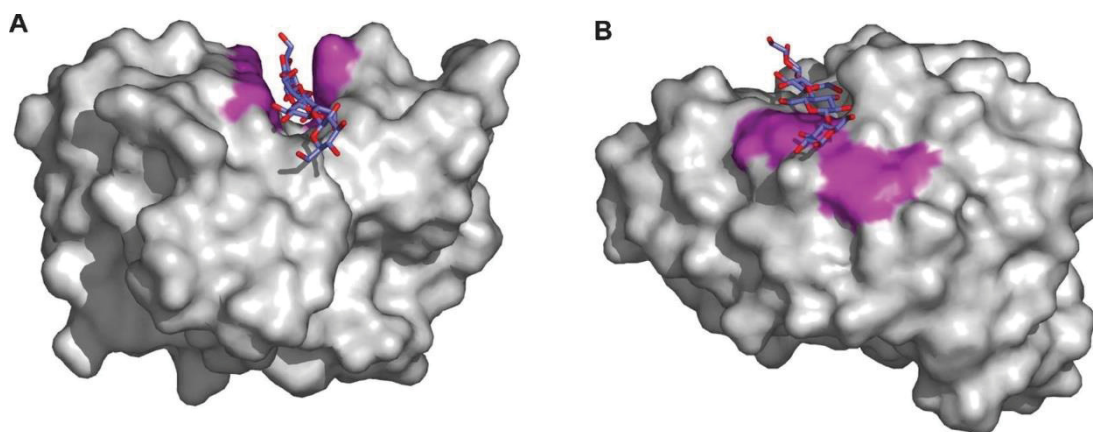


FIGURA 7 – ESTRUTURA DE MÓDULOS DE LIGAÇÃO À CARBOIDRATOS (CBM) DE FAMÍLIAS: (A) CBM DE FAMÍLIA 4 COMPLEXADO COM CELOPENTAOSE E (B) CBM DE FAMÍLIA 17 COMPLEXADO COM CELOTETRAOSE. FONTE: Boraston et al. (2004).

Assim como as glicosil hidrolases, os CBMs são classificados em famílias de acordo com sua sequência de aminoácidos e, consequentemente, pelas suas estruturas secundárias e terciárias. Existem hoje 81 diferentes famílias de CBMs já catalogadas (CAZY, 2017). Os CBMs podem apresentar diferentes estruturas de ligação, sendo duas delas apresentadas na Figura 7: túneis finos (Figura 7A) e estruturas planares (Figura 7B). A afinidade dos CBMs à celulose se dá principalmente por ligações de hidrogênio entre as hidroxilas da celulose e resíduos aromáticos que em sua maioria correspondem a triptofano e tirosina (BORASTON et al., 2004). Além de promover a adsorção das celulases sobre a fibra, os CBMs também atuam como direcionadores para ações processivas de exoglucanases e de endoglucanases

processivas e ainda podem apresentar efeitos disruptivos via ligações de hidrogênio, que reduzem a interação entre cadeias adjacentes de celulose (GUILLÉN et al., 2010).

Recentemente, outras proteínas auxiliares não hidrolíticas têm sido identificadas e incorporadas em preparados celulolíticos comerciais de última geração (ver Figura 4). Dentre essas estão as suoleninas e as monooxigenases líticas de polissacarídeos (LPMO, do inglês *lytic polysaccharide monooxygenases*), como as AA9 (*Auxiliary Activity Family 9*). Estas exercem papel fundamental na obtenção de altos níveis de sacarificação (HARRIS et al., 2014).

As suoleninas são proteínas semelhantes às expansinas vegetais. Expansinas possuem um papel de diminuição da interação entre cadeias de celulose durante o crescimento das plantas (MCQUEEN-MASON et al., 1992; COSGROVE, 2005). Algumas proteínas produzidas por fungos e bactérias possuem certa semelhança estrutural e funcional com as expansinas. Este é o caso das suoleninas expressas por *Trichoderma reesei*, as quais podem diminuir a cristalinidade da celulose pelo rompimento das ligações de hidrogênio, aumentando a acessibilidade das celulasas à celulose. Tal processo é denominado amorfogênese (SALOHEIMO et al., 2002; BROTMAN et al., 2008; ARANTES, 2010; HARRIS et al., 2014).

Por sua vez, as monooxigenases polissacarolíticas (LPMOs, do inglês *lytic polysaccharide monooxygenases*) são enzimas que partilham de um mecanismo de oxidação (FUSHINOBU, 2014). Embora o mecanismo reacional dessas enzimas ainda não esteja totalmente elucidado, elas compartilham de uma superfície planar de coordenação com o íon de um metal de transição (em geral Cu^{2+}) e necessitam da presença de oxigênio molecular e de um doador de elétron (DIMAROGONA et al., 2013). O fato destas enzimas serem ativas tanto em celulose cristalina como em celulose amorfa faz com que a adição destas à complexos celulolíticos represente uma diminuição pela metade na quantidade de enzima necessária à hidrólise (HARRIS et al., 2010; BEESON et al., 2012), apresentando-se como ponto chave dos recentes avanços da biotecnologia voltada à sacarificação da celulose (HARRIS et al., 2014).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DE NOVAS CELULASES

O desenvolvimento da etapa de hidrólise implica, dentre outras necessidades, na otimização da composição das enzimas presentes nos complexos celulolíticos e

dentro deste contexto estão inseridos os estudos voltados à identificação e caracterização de novas enzimas. A busca por novas enzimas para este processo é baseada no estudo genômico de micro-organismos que apresentam algum potencial e, uma vez que um gene de interesse é identificado, este é clonado e a enzima é então produzida.

Os estudos de caracterização dessas enzimas podem envolver uma variedade de ensaios relativos ao entendimento dos modos de ação e de determinação da atividade sobre diferentes substratos, como também aqueles voltados à identificação de efeitos sinérgicos estabelecidos com outras celulasas. Dentre estes, a determinação da liberação de açúcares redutores solúveis (AR_{sol}) e insolúveis (AR_{insol}) proposta por Silveira et al. (2012) representa uma interessante ferramenta na caracterização do modo de ação de celulasas. Tal metodologia é capaz de segregar os produtos de hidrólise de uma enzima ou de um complexo celulolítico em produtos provenientes de atividades tipicamente endoglucanásicas (insolúveis) e produtos provenientes de atividades exoglucanásicas e β -glucosidásicas (solúveis).

Devido a heterogeneidade composicional e estrutural de substratos lignocelulósicos, os estudos de caracterização enzimática geralmente empregam substratos puramente celulósicos e estruturalmente padronizados. Isto proporciona uma comparação direta de diferentes enzimas em estudos realizados por diferentes grupos de pesquisa. Desses substratos modelo, a celulose microcristalina inchada com ácido fosfórico (PASC, do inglês *phosphoric acid swollen cellulose*) e celulose bacteriana (*Gluconobacter xylinum*) foram empregadas neste trabalho.

A PASC é um substrato amorfo obtido a partir do inchamento da celulose microcristalina. Uma vez que o material de origem é obtido a partir de um tratamento ácido, espera-se que o seu grau de polimerização seja baixo, próximo ao limite para a formação de arranjos cristalinos estáveis. Segundo (ZHANG e LYND, 2005), esse tipo de material apresenta grau de polimerização entre 250 a 350 resíduos de anidroglicose. Por outro lado, a celulose bacteriana produzida por *Gluconobacter xylinum* apresenta elevado grau de polimerização (cerca de 2000 resíduos de anidroglicose) (KESHK, 2014) e uma estrutura cristalina altamente organizada (PARK et al., 2010).

2.4 GLICOSIL HIDROLASES DE FAMÍLIAS 9 E 48 EXPRESSAS POR *Bacillus licheniformis*

Bacillus licheniformis é uma bactéria gram-positiva facilmente isolada do solo e de materiais vegetais. O fato desse micro-organismo tolerar ambientes alcalinos faz com que proteases expressas por esses apresentem estabilidade e elevada atividade nestas condições e, portanto, sejam largamente empregadas na formulação de detergentes. Não obstante, *B. licheniformis* também apresenta codificado em seu genoma um sistema celulolítico capaz de catalisar ligações glicosídicas para degradação de celulose e de outros componentes da parede celular vegetal (VEITH et al., 2004). Dentre estas proteínas encontram-se presentes uma endoglucanase processiva da Família 9 e uma de exoglucanases da Família 48 (*B/Cel9A* e *B/Cel48A*, respectivamente).

A Família 9 das glicosil hidrolases é composta basicamente por endoglucanases e algumas endoglucanases processivas. Todas as estruturas de domínios catalíticos relatadas até o momento apresentam um enovelamento do tipo barril com repetições de $(\alpha/\alpha)_6$ e sítio catalítico aberto em forma de fenda, que contém pelo menos seis subsítios de ligação. Além disto, todas as endoglucanases processivas desta família possuem um CBM da Família 3C que apresenta estrutura planar alinhada com o sítio catalítico cujo papel é fundamental para a atuação processiva destas celulasas (SAKON et al., 1997; ARAÚJO, 2016).

Por sua vez, as celulasas de Família 48 apresentam uma maior variedade de funções. Dentre estas já foram identificadas atividades endoglucanásicas, quitinásicas, endoglucanásica processivas e celobioidrolásicas. Embora as celulasas da Família 48 também sejam expressas em sua forma livre, geralmente apresentam-se como subunidades mais abundantes em bactérias produtoras de celulosomas, que são complexos multienzimáticos onde diferentes enzimas são ancoradas em uma estrutura basal (DASSA, 2012).

ARAÚJO (2016) realizou recentemente a clonagem, expressão e purificação de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* a fim de realizar estudos estruturais e de função enzimática. Dentre 18 diferentes substratos celulósicos e hemicelulósicos, as celulasas apresentaram elevadas atividades contra PASC e celulose bacteriana e atividades menos expressivas sobre papel filtro, Sigmacell, carboximetilcelulose (CMC - polímero derivado da celulose) e Avicell (celulose microcristalina). Ambas apresentaram

atividade ótima na temperatura de 60 °C, porém, em distintos pHs, sendo 7,0 o pH ótimo para *B/Cel9A* e 5,0 para *B/Cel48A*. Além disto, estudos estruturais revelaram os mesmos perfis obtidos para demais endoglucanases processivas da Família GH9, enquanto que ainda não se obteve dados cristalográficos para elucidação completa da estrutura da *B/Cel48A*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar o modo de ação e sinergismo entre duas celulasas de famílias GH9 e GH48 de *Bacillus licheniformis* (*B/Cel9A* e *B/Cel48A*, respectivamente) durante a hidrólise de substratos celulósicos a partir da caracterização de seus perfis de liberação de açúcares solúveis e insolúveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Expressar e purificar *B/Cel9A* e *B/Cel48A*;
- B. Definir condições intermediárias entre os pHs e temperaturas de atividade ótima de cada enzima;
- C. Caracterizar os substratos celulósicos (celulose bacteriana e celulose inchada em ácido fosfórico) quanto aos seus índices de cristalinidade e grau de polimerização;
- D. Avaliar os efeitos sinérgicos e os perfis de liberação de açúcares solúveis e insolúveis por *B/Cel9A* e *B/Cel48A* correlacionando-os com as características estruturais dos substratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PRODUÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS

4.1.1 Celulose inchada em ácido fosfórico (PASC)

A celulose inchada com ácido fosfórico (PASC) foi obtida conforme descrito por KIM et al. (2012). Dois gramas de Avicel® PH-101 (Fluka) foram dissolvidas em 50 mL de ácido fosfórico 85% (Synth). Após agitação por 1 h a 4 °C, a solução foi diluída em 500 mL de água resfriada a 4 °C e agitada por mais 1 h nesta mesma temperatura. O material amorfo foi então coletado por filtração em papel filtro e lavado 4 vezes com água ultrapura, 2 vezes com solução de 1% de bicarbonato de sódio e, então, mais 3 vezes com água ultrapura. O material foi então ressuspensionado no tampão de trabalho (citrato/fosfato 150 mmol L⁻¹ pH 5,5). Por fim, o teor de sólidos totais foi determinado por gravimetria e ajustado à concentração de trabalho por diluição.

4.1.2 Celulose bacteriana

A celulose bacteriana de *Acetobacter xylinum* (*Gluconobacter xylinum*) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Igor Polikarpov. Filmes de celulose bacteriana úmidos foram rapidamente homogeneizados com água em liquidificador, proporcionando uniformidade da massa de celulose bacteriana utilizada em cada ensaio. Após homogeneização, o material foi filtrado e ressuspensionado no tampão de trabalho (citrato/fosfato 150 mmol L⁻¹ pH 5,5). Então, o teor de sólidos foi determinado por gravimetria e ajustado para 2% (m/m).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS

4.2.1 Difratomia de Raios-X

As propriedades cristalográficas das amostras de celulose foram analisadas por difratometria de raios-X. Uma pequena quantidade de amostra liofilizada foi colocada sobre um porta-amostra e levemente compactada com uma placa de vidro para uniformizar a superfície. Os difratogramas foram obtidos em um difratômetro Shimadzu XRD-7000 (radiação de Cu K α a 40 kV e 20 mA) com varredura de 3° < 2 θ < 60° a uma velocidade de 2° min⁻¹. Os índices de cristalinidade (ICr) das amostras

foram determinados pelo método empírico proposto por SEGAL et al. (1959), através da Equação 1:

$$ICr = \frac{I_{22,5^\circ} - I_{am}}{I_{22,5^\circ}} \times 100 \quad \text{EQUAÇÃO 1}$$

onde $I_{22,5^\circ}$ é a intensidade do pico em $22,5^\circ$ de 2θ , que corresponde à reflexão 110 para celulose I_α e 200 para celulose I_β , e I_{am} é a contribuição da fração amorfa do material, que está localizada em $18,5^\circ$ de 2θ .

4.2.2 Cromatografia de exclusão por tamanho

A técnica de cromatografia de exclusão por tamanho foi utilizada para mensurar o grau de polimerização (GP) das amostras de celulose. Para tanto, se fez necessária a derivatização das amostras (reação de carbamilação). Cerca de 50 mg das amostras, lavadas em água, liofilizadas e secas contra pentóxido de fósforo foram suspensas em 4 mL de piridina e então reagidas com 0,5 mL de isocianato de fenila em bloco de aquecimento a 80°C e agitação ocasional. Após 48 h, as reações foram interrompidas pela adição de 5 mL de metanol e imediatamente precipitadas sob agitação magnética em uma mistura metanol:água (80:20 v/v). Para auxiliar a precipitação, as amostras permaneceram durante uma noite a 4°C . Por fim, os produtos foram lavados 3 vezes com solução metanol:água (80:20 v/v) e posteriormente secos contra pentóxido de fósforo em dessecador.

Uma vez derivatizadas, as amostras foram diluídas em tetraidrofurano (THF) em concentrações de aproximadamente 4 g L^{-1} e eluídas em sistema Waters 1515 provido de um detector de rede de fotodiodos Waters 2487 (240 nm) e um amostrador automático Waters 2707. Foram empregadas quatro colunas TSK Gel em série com limites de exclusão equivalentes a 4×10^7 (TSK G6000 HXL), 4×10^5 (TSK G4000 HXL), 6×10^4 (TSK G3000 HXL) e 1×10^3 (TSK G1000 HXL) u.m.a.. A eluição de 20 μL de cada amostra foi conduzida empregando tetraidrofurano (THF) como fase móvel a uma vazão de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 45°C .

Uma curva de calibração foi obtida a partir do perfil de eluição de 20 padrões monodispersos de poliestireno com massas molares médias entre 2.000 e 8.420.000 Da sob as mesmas condições. Então, as massas molares aparentes das

amostras de celulose foram calculadas utilizando o método de calibração universal de acordo com as constantes de Mark-Houwink para os padrões de poliestireno e para celulose per-carbamilada (VALTASAARI, 1975), conforme demonstrado na Equação 2,

$$\ln M_c = \frac{(1 + \alpha_p) \ln M_p + \ln(K_p/K_c)}{1 + \alpha_c} \quad \text{EQUAÇÃO 2}$$

onde M_c e M_p correspondem às massas moleculares da celulose e do poliestireno, respectivamente; α_c e α_p correspondem às constantes alfa de Mark-Houwink para celulose (0,92) e poliestireno (0,74) em THF, respectivamente; e K_c e K_p correspondem às constantes κ de Mark-Houwink para celulose ($2,01 \times 10^{-5}$) e poliestireno ($1,18 \times 10^{-4}$) em THF, respectivamente.

Com base na curva de calibração, as médias ponderadas das massas molares (MM_M), as médias numéricas das massas molares (MM_N) e as polidispersividades (que representam o grau de dispersão da massa molar, PD) foram calculadas conforme observado nas Equações 3, 4 e 5:

$$MM_M = \frac{\sum(n_i M_i^2)}{\sum(n_i M_i)} \quad \text{EQUAÇÃO 3}$$

$$MM_N = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} \quad \text{EQUAÇÃO 4}$$

$$PD = \frac{MM_M}{MM_N} \quad \text{EQUAÇÃO 5}$$

onde MM_M e MM_N correspondem às médias ponderadas e às médias numéricas das massas molares, respectivamente; n_i corresponde o número de moléculas de espécie i ; M_i corresponde à massa molar da espécie i , e PD representa a polidispersividade.

Por fim, os graus de polimerização associados aos diferentes valores de MM_M e MM_N foram determinados pela razão entre estas médias e a massa molar de uma

molécula de anidroglicose per-carbamilada (519 u.m.a.) (HALLAC e RAGAUSKAS, 2011).

4.3 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE *B/Cel9A* E *B/Cel48A*

Os processos de clonagem, expressão e purificação das enzimas de interesse foram realizados no laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Física de São Carlos, em parceria com o doutorando Evandro Ares de Araújo e sob supervisão do Prof. Dr. Igor Polikarpov, conforme o procedimento descrito em Araújo (2016).

A partir do DNA genômico de *B. licheniformis* DSM-13 (ATCC 14580), os genes responsáveis pela expressão de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* (GenBank: *AAU40775.1* e *AAU234116.1*, respectivamente) foram clonados no vetor de expressão pETTRXA-1a\LIC em sistema de clonagem independente de ligase (LIC) (CAMILO e POLIKARPOV, 2014) e transformados individualmente em *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen). O processo de expressão se deu por crescimento celular de 5 h a 37 °C e expressão por 25 h a 20 °C, sendo o meio de cultura autoindutor do tipo ZYM-5052 (STUDIER, 2005) suplementado com canamicina e cloranfenicol em concentrações de 50 e 25 µg/mL, respectivamente. Ao final, as células foram concentradas por centrifugação a 6.000 rpm e ressuspensas em tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ (pH 7,0), complementado de 150 mmol L⁻¹ de NaCl e 1 mmol L⁻¹ de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF do inglês *phenylmethylsulfonyl fluoride*) como inibidor de proteases.

As células ressuspensas foram submetidas a um processo de ruptura celular (lise) por ultrassom e separadas por centrifugação a 1.800 rpm. Do sobrenadante foram separadas as proteínas de interesse em uma resina de afinidade de Ni-NTA Agarose (Quiagen), uma vez que apresentam uma cauda de 6 resíduos de histidina que interage fortemente com a resina. Para remoção de contaminantes, lavagens foram realizadas com tampão Tris-HCl 20 mmol L⁻¹ (pH 7,0) complementado com 150 mmol L⁻¹ de NaCl e 20 mmol L⁻¹ de imidazol; posteriormente, realizou-se a eluição das proteínas de interesse aumentando a concentração de imidazol do tampão de eluição para 200 mmol L⁻¹. As proteínas foram então dialisadas para remoção do imidazol e submetidas a clivagem da cauda de histidina com TEV protease (do inglês *Tobacco Etch Virus*) durante incubação por 24 h sob agitação rotativa à temperatura ambiente. Por fim, a solução proteica foi submetida novamente à coluna de Ni-NTA Agarose para

remoção das caudas de histidina em solução e, então, dialisada com o tampão de trabalho (Tampão citrato/fosfato 150 mmol L⁻¹ pH 5,5).

4.4 ELETROFOSESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Análises de eletroforese dos extratos em diferentes estágios da purificação foram realizadas para avaliar qualitativamente a composição e a pureza do produto final. Para tanto, amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE – do inglês *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), conforme descrito por SCHÄGGER e VON JAGOW (1987). Ao fim da eletroforese, os géis permaneceram submersos por uma noite em solução de Azul de Comassie para visualização das bandas proteicas. O excesso de Azul de Comassie foi removido por lavagem com solução de ácido acético (10% v/v).

4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE PROTEÍNAS

As concentrações das proteínas em solução foram determinadas em Espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific) baseado na Lei de Lambert-Beer conforme demonstrado na Equação 6.

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \text{EQUAÇÃO 6}$$

onde A é a absorbância em 280 nm, ε é a absorvidade molar de cada proteína ($\varepsilon_{B/Cel9A} = 185.650 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\varepsilon_{B/Cel48A} = 240.080 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) com base nos estudos de sequenciamento realizados por Araújo (2016), b é o caminho óptico das amostras no equipamento (cm) e c é a concentração da proteína de interesse em mol L⁻¹.

4.6 ENSAIOS HIDROLÍTICOS

A liberação de açúcares redutores durante os diferentes ensaios hidrolíticos foi quantificada conforme o método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) proposto por MILLER (1959). Este método baseia-se na redução do DNS ao ácido 3-amino-5-

nitrosalicílico pelos terminais redutores dos carboidratos. O ácido 3-amino-5-nitrosalicílico absorve fortemente em 540 nm e a quantificação dos açúcares foi então realizada indiretamente por espectrofotometria empregando uma glucose como padrão externo em concentrações que variaram de 0,10 a 2,00 mg mL⁻¹. Todas as análises foram realizadas em triplicada e os respectivos desvios padrões foram calculados.

4.6.1 Definição do pH de trabalho

Para a definição do pH de trabalho, foram comparadas as atividades de cada enzima no pH intermediário de 5,5 com relação ao pH ótimo de cada uma, sendo 7,0 para *B/Cel9A* e 5,0 para *B/Cel48A*. As hidrólises foram conduzidas em volume de 200 µL, temperatura de 60 °C, agitação de 200 rpm e concentrações de 1,2 µmol L⁻¹ e 10,0 µmol L⁻¹ para *B/Cel9A* e *B/Cel48A*, respectivamente, utilizando PASC (0,1%) como substrato. Ao término do tempo reacional de 1 h, as amostras foram fervidas por 5 min para a desnaturação das enzimas e os açúcares foram posteriormente quantificados por DNS.

4.6.2 Ensaios de termoestabilidade

Amostras de *B/Cel9A* (1,2 µmol L⁻¹) e *B/Cel48A* (10,0 µmol L⁻¹) foram submetidas à incubação nas temperaturas de 40, 50 e 60 °C e agitação de 200 rpm por 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h. Posteriormente, estas amostras foram conduzidas à hidrólise de celulose inchada em ácido fosfórico (PASC) (1,0%) em tampão citrato/fosfato 150 mmol L⁻¹ (pH 5,5) por 1 h, em volume reacional de 200 µL, a 200 rpm nas respectivas temperaturas de incubação. Ao fim do tempo reacional, as enzimas foram desnaturadas por fervura (5 min). Os açúcares foram quantificados segundo o método de DNS e as atividades foram determinadas novamente e relacionadas à atividade, em cada temperatura, das celulases não submetidas à incubação.

4.6.3 Perfis de liberação de açúcares solúveis e insolúveis e determinação do grau de sinergismo

Os perfis de liberação de açúcares solúveis (AR_{Sol}) e insolúveis (AR_{Insol}) foram determinados conforme metodologia proposta por SILVEIRA et al. (2012). As hidrólises foram conduzidas sob diferentes cargas enzimáticas e tempos reacionais, mantendo o volume em 200 μ L, a agitação em 200 rpm e as condições otimizadas de pH (tampão citrato/fosfato 150 mmol L⁻¹ pH 5,5) e temperatura (40 °C). Após determinado o tempo reacional, os microtubos foram fervidos (5 min) para desnaturar as enzimas.

Os açúcares redutores totais (AR_{Tot}) foram determinados adicionando o reagente de DNS diretamente no tubo reacional. Por sua vez, os açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) foram determinados a partir de uma alíquota solúvel da reação, após centrifugação. Desta forma, os açúcares redutores insolúveis (AR_{Insol}) foram determinados indiretamente pela subtração dos AR_{Sol} de AR_{Tot} e o desvio padrão calculado a partir do método de propagação de erro.

Além dos estudos da ação individual de *B/Cel9A* e *B/Cel48A*, também foram realizados estudos com a mistura de diferentes proporções molares entre estas celulasas. Assim, foi possível determinar os graus de sinergia que foram calculados conforme a Equação 7 (KUMAR e WYMAN, 2009):

$$\text{Grau de sinergia} = \frac{AR_{Mistura}}{AR_{B/Cel9A} + AR_{B/Cel48A}} \quad \text{EQUAÇÃO 7}$$

onde $AR_{Mistura}$ são os açúcares redutores liberados pela ação sinérgica de *B/Cel9A* e *B/Cel48A*; e $AR_{B/Cel9A}$ e $AR_{B/Cel48A}$ são as liberações de açúcares redutores pela ação individual de *B/Cel9A* e *B/Cel48A*, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SUBSTRATOS CELULÓSICOS

Embora os substratos celulósicos empregados neste trabalho sejam comumente utilizados na literatura, as diferentes condições de preparo tanto para a reação de inchamento de Avicel PH-101 (Sigma Aldrich) para obtenção de PASC quanto para o cultivo de *Acetobacter xylinum* poderiam resultar em características distintas das observadas na literatura. Desta forma, as análises de difratometria de raios-X e a determinação dos graus de polimerização foram indispensáveis para a uma completa discussão sobre a ação de *B/Cel9A* e *B/Cel48A*.

5.1.1 Difratometria de Raios-X

A Figura 8 apresenta os difratogramas de raios-X obtidos para celulose bacteriana e PASC, assim como para Avicel, material utilizado para produção de PASC por inchamento em ácido fosfórico xaroposo.

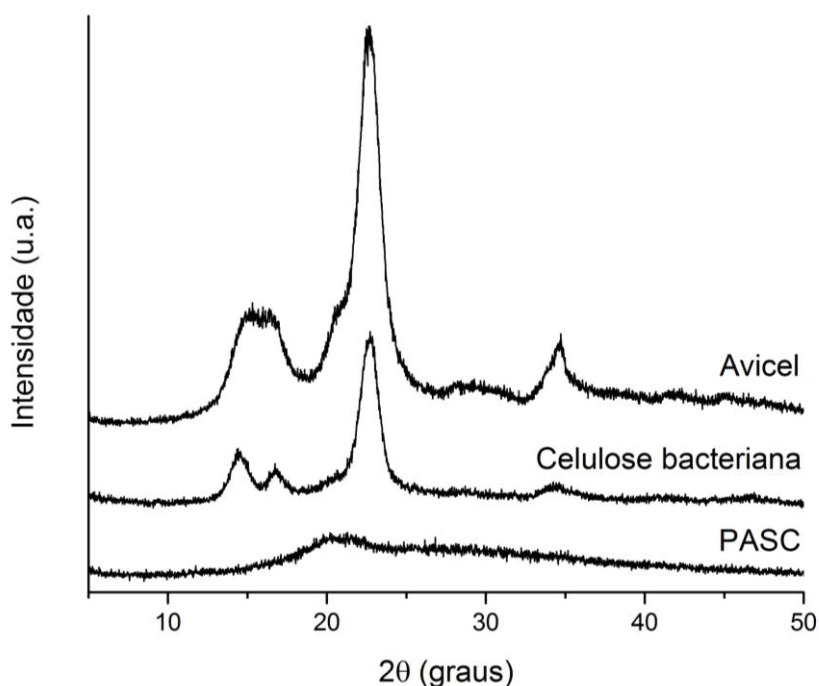


FIGURA 8 – DIFRATOGRAMAS DE RAIOS-X DE AVICEL, CELULOSE BACTERIANA E CELULOSE INCHADA EM ÁCIDO FOSFÓRICO (PASC).

Com base nos perfis dos difratogramas obtidos, fica evidente a presença de fases cristalinas para Avicel e celulose bacteriana e a ausência de picos referentes às fases cristalinas para PASC. Em ambas as amostras de Avicel e de CB, o pico de maior intensidade, obtido em $22,5^\circ$ de 2θ , refere-se ao plano de difração 002 da celulose. Tais amostras também apresentam um pico característico de celulose I em $34,5^\circ$ de 2θ , que é referente ao plano de difração 040 (PENTTILÄ et al., 2010). Para celulose bacteriana, ainda é possível observar dois picos bem definidos em $14,3^\circ$ e $16,8^\circ$ de 2θ , característicos dos planos 010 e 100 de celulose I_α , enquanto que a Avicel apresenta sobreposição destes dois picos com os picos relativos a celulose I_β ($16,7^\circ$ e $14,9^\circ$ de 2θ) devido à presença desses dois arranjos cristalinos ou formas alomórficas em sua estrutura (WADA et al., 2003). A partir dos difratogramas foi possível, então, determinar os índices de cristalinidade para Avicel e celulose bacteriana.

O grau de cristalinidade ainda é considerado um dos fatores mais importantes para explicar a recalcitrância da celulose em processos de conversão química ou biológica (VALTASAARI, 1975; FOCKINK et al., 2016). Por exemplo, foi demonstrado que a celulose inchada em ácido fosfórico, que apresenta caráter praticamente amorfo, apresenta susceptibilidade à hidrólise enzimática aproximadamente 20 vezes superior a amostras de celulose microcristalina como Avicel (ZHANG e LYND, 2004). Embora técnicas mais robustas estejam relatadas na literatura para a análise do índice de cristalinidade da celulose, tais como a difração de elétrons e a Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C no Estado Sólido (PARK et al., 2010), a difratometria de raios-X aliada à determinação dos índices de cristalinidade pelo método de SEGAL et al. (1959) proporciona uma análise simples e rápida que permite uma comparação satisfatória entre diferentes amostras de celulose (PARK et al., 2010). Nesse método empírico, os índices de cristalinidade são obtidos por uma correlação direta entre a altura do pico de maior intensidade (I_{002}), referente à reflexão 002 ($22,5^\circ$ de 2θ) e a altura mínima (I_{am}) entre os picos referentes às reflexões de 002 e 101, que está relacionada à contribuição das regiões amorfas do material.

Os índices de cristalinidade obtidos para Avicel e celulose bacteriana foram 67,0 e 64,6%, respectivamente. Ainda que a Avicel não tenha sido empregada nesse trabalho como substrato para a hidrólise por *B/Cel9A* e *B/Cel48A*, devido à baixa atividade dessas enzimas sobre esse substrato, houve interesse em observar a mudança de cristalinidade perante a reação de inchamento em ácido fosfórico para demonstrar a obtenção de um substrato amorfo. Neste sentido, foi possível observar

a redução do grau de cristalinidade praticamente a zero. Com relação à celulose bacteriana, observou-se que o seu índice de cristalinidade corresponde ao já relatado na literatura por outros autores para amostras similares e quantificações também realizadas pelo método de altura de pico proposto por SEGAL et al. (1959). KESHK e SAMESHIMA (2005) observaram índices de cristalinidade que variaram entre 75-88% quando utilizadas diferentes fontes de carbono no meio de cultura de *Acetobacter xylinum*, enquanto CHENG et al. (2017) obtiveram valores entre 66,5-70,3% empregando frações solúveis de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

5.1.2 Cromatografia de exclusão por tamanho

Outra importante característica da celulose que exerce influência sobre a hidrólise enzimática é o grau de polimerização. O grau de polimerização representa a quantidade de resíduos de anidroglicose que compõem uma cadeia de celulose e pode ser determinado por cromatografia de exclusão por tamanho mediante carbamilação da celulose com isocianato de fenila para torná-la solúvel em tetraidrofurano (THF). A Figura 9 apresenta os perfis de eluição das amostras de celulose per-carbamiladas que foram submetidas à cromatografia de exclusão por tamanho.

A cromatografia de exclusão por tamanho baseia-se na percolação dos analitos por uma coluna de fase estacionária porosa. Moléculas de menor massa molar têm a capacidade de penetrar por poros que não estão acessíveis para moléculas de massa molar mais elevada. Desta forma, moléculas maiores eluem primeiro. Sendo assim, fica evidente na Figura 9 que Avicel e PASC apresentam massas molares semelhantes ao passo que a celulose bacteriana apresenta massa molar superior às demais. Também é notória a presença de um “ombro” nas amostras de Avicel e PASC, que está relacionado à presença de componentes de menor massa molecular. Com base no perfil de eluição das amostras e dos padrões de poliestireno, foi possível então determinar as massas e os números molares médios para cada amostra, assim como as polidispersividades correspondentes. Esses resultados são apresentados na Tabela 1.

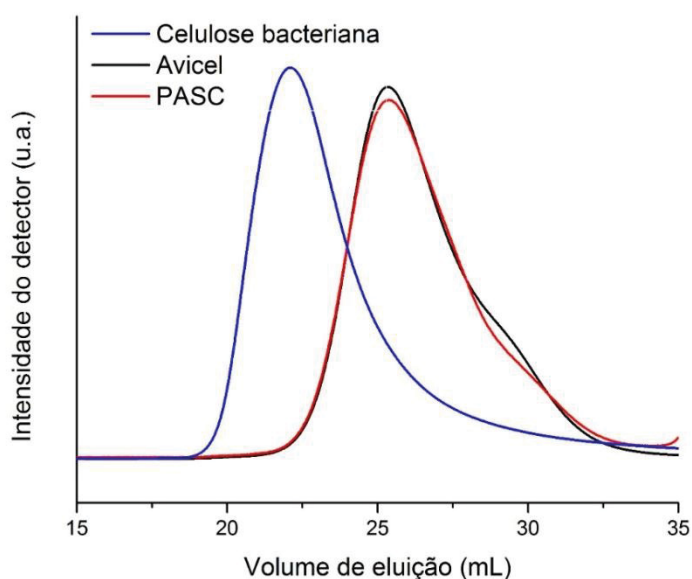


FIGURA 9 – PERFIS DE ELUIÇÃO OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS DE CELULOSE PER-CARBAMILADAS POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.

TABELA 1 – MASSAS MOLARES, GRAUS DE POLIMERIZAÇÃO E POLIDISPERSIVIDADE DAS AMOSTRAS DE CELULOSE.

Amostra	Massas molares (Da)		Graus de polimerização		PD ⁵
	MM _M ¹	MM _N ²	GP _M ³	GP _N ⁴	
Avicel	114.119	37.837	220	73	3,02
PASC	123.194	33.049	237	64	3,73
CB	1.172.270	95.286	2.259	184	12,30

¹ MM_M – massa molar média

² MM_N – massa molar numérica média

³ GP_M – grau de polimerização associado à massa molar média (MM_M)

⁴ GP_N – grau de polimerização associado à massa numérica média (MM_N)

⁵ PD – polidispersividade (PD = MM_M/MM_N)

Conforme observado na Tabela 1, a Avicel per-carbamilada apresentou uma massa molar média de aproximadamente 114 kDa, que corresponde a um grau de polimerização de 219 resíduos de anidroglicose. O baixo grau de polimerização deste material é justificado pelo processo sob o qual ele é submetido durante a sua produção e este valor se adequa ao observado na literatura que, aponta graus de polimerização

para celulose microcristalina abaixo de 350 resíduos de anidroglicose (THOORENS et al., 2014). A Avicel PH-101 (Sigma Aldrich) é produzida a partir de fibras deslipidadas de algodão mediante um tratamento ácido, no qual ligações glicosídicas presentes em regiões acessíveis ou menos cristalinas são hidrolisadas. Como resultado, observa-se nesta etapa uma redução considerável no grau de polimerização, ao passo que o material preserva majoritariamente as suas regiões cristalinas. Considerando que a PASC foi obtida a partir do inchamento da Avicel com ácido fosfórico a baixas temperaturas para evitar a hidrólise das glucanas, era esperado que os graus de polimerização desses materiais fossem semelhantes.

A celulose bacteriana per-carbamilada apresentou massa molar média de aproximadamente 1.172 kDa, correspondentes a um grau de polimerização de 2.259 resíduos de anidroglicose. Graus de polimerização de celulose bacteriana variam entre 800 e 10.000 resíduos de anidroglicose (KLEMM et al., 2005) e esta ampla faixa está relacionada sobretudo à espécie de bactéria utilizada, suas condições de cultivo e às modificações genéticas realizadas em determinadas linhagens (STROBIN et al., 2004). Por fim, a celulose bacteriana, apresenta elevada polidispersividade quando comparado à Avicel e PASC.

A partir das caracterizações acima descritas, observam-se dois modelos de celulose com características totalmente distintas. Um deles com elevado grau de polimerização e elevada cristalinidade (celulose bacteriana) e outro amorfo e com baixo grau de polimerização (PASC). Isso proporcionou a caracterização do modo de ação de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* quando submetidas à hidrólise desses diferentes materiais celulósicos.

5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE *B/Cel9A* E *B/Cel48A*

A eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é uma análise qualitativa amplamente empregada durante o acompanhamento de processos de purificação de proteínas. Nela, diferentes proteínas são separadas de acordo com sua relação massa/carga quando submetidas a uma diferença de potencial. A análise qualitativa da pureza das frações provenientes das etapas de expressão e purificação das celulasas de interesse neste trabalho encontram-se apresentadas na Figura 10.

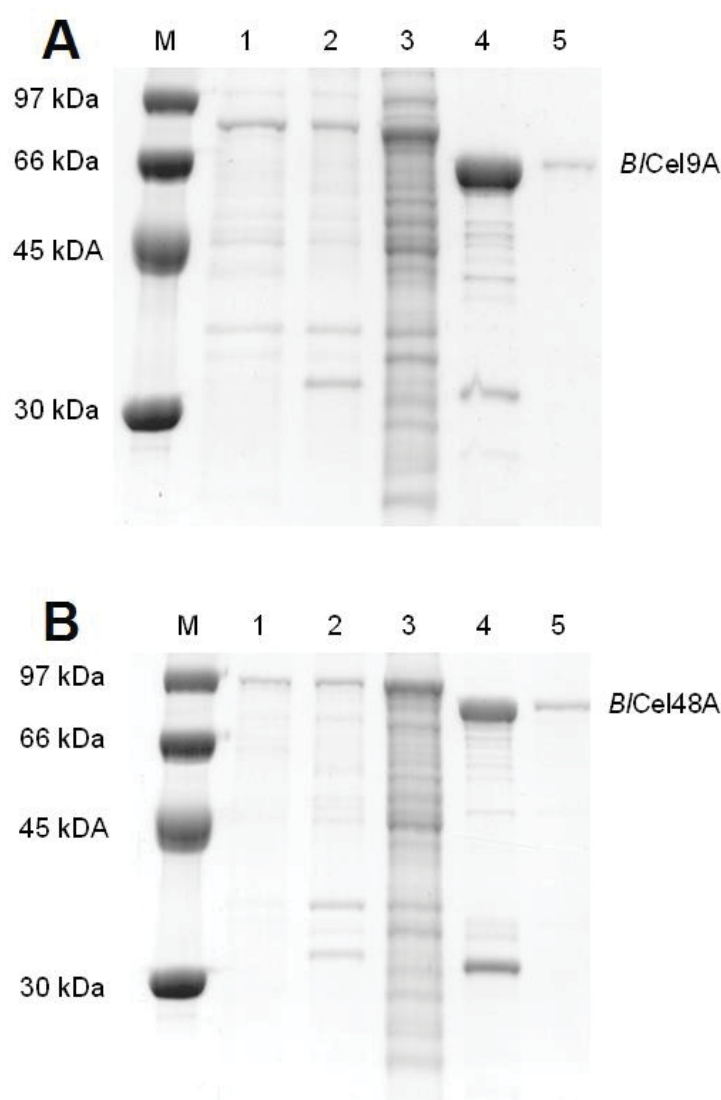


FIGURA 10 - ELETROFORESE EM SDS-PAGE DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE (A) *B/Cel9A* E (B) *B/Cel48A*: (M) PADRÕES DE MASSA MOLECULAR; (1) FRAÇÃO INSOLÚVEL DO LISADO; (2) FRAÇÃO ELUÍDA DA COLUNA DE AFINIDADE; (3) FRAÇÃO SOBRENADANTE DO LISADO; (4) FRAÇÃO OBTIDA APÓS CLIVAGEM COM TEV-PROTEASE E (5) CELULASE PURIFICADA POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO.

Como observado, as frações sobrenadantes dos lisados (poços de número 3) apresentam uma variedade de proteínas de diferentes massas moleculares, embora seja possível observar uma maior expressão das enzimas de interesse. Nessa etapa, ambas *B/Cel9A* e *B/Cel48A* ainda apresentam em sua estrutura a cauda de 6 resíduos de histina e o sítio de clivagem da protease TEV, o que faz com que sua massa molecular seja levemente superior. Ainda, pequenas

quantidades de proteínas são observadas na fração insolúvel do lisado (poços de número 1) e na fração solúvel que não se ligou à resina de Ni-NTA Agarose (poços de número 2).

Nos poços de número 4, pode-se ainda observar que as enzimas de interesse já apresentam uma massa molecular menor quando comparadas aos poços de número 3. Isto está relacionado com a perda de seu marcador (cauda de histidina) pela ação da TEV-protease que também é observada nesta fração como proteína de segunda maior concentração. Por fim, nos poços de número 5, é possível observar as celulasas de interesse após purificação por cromatografia de exclusão por tamanho, caracterizada pela presença de banda proteica majoritária no gel de poliacrilamida.

5.3 DEFINIÇÃO DO pH E DA TEMPERATURA DE TRABALHO

Uma vez que se pretendia avaliar o sinergismo estabelecido entre as duas celulasas de *B. licheniformis*, houve a necessidade de determinar um pH de trabalho intermediário em relação aos ótimos de cada uma das enzimas. Também foram avaliadas a termoestabilidade das enzimas sob diferentes temperaturas para garantir sua atividade ao longo dos diferentes períodos de hidrólise aos quais seriam submetidas. A padronização desse sistema para condições intermediárias de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* foi necessária para garantir que os ensaios realizados com a mistura de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* fossem conduzidos exatamente nas mesmas condições dos ensaios individuais realizados para cada enzima. Tais considerações estão apresentadas nas Figuras 11 e 12.

Considerando o pH ótimo de cada enzima bem como os perfis de redução de atividade em diferentes intervalos de pH (ARAÚJO, 2016), adotou-se o pH de 5,5 como pH intermediário e a atividade relativa neste pH foi avaliada perante a atividade em pH ótimo de cada enzima em separado. Inesperadamente, como observado na Figura 11, não foram observadas diferenças significativas entre as atividades encontradas nos diferentes pHs. Considerando que os ensaios descritos por Araújo (2016) foram realizados em tampão acetato/borato/fosfato (ABF), o qual permite uma varredura em ampla faixa de pH, a mudança da composição do tampão de trabalho para citrato/fosfato provavelmente motiva tal efeito. Desta forma, adotou-se o pH de 5,5 para a condução dos ensaios subsequentes.

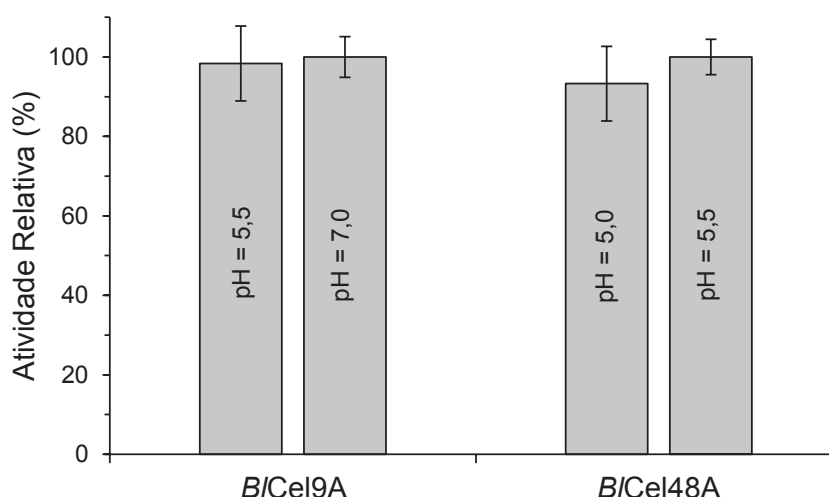


FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE RELATIVA (%) DE *B/Cel9A* ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) E *B/Cel48A* ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) EM UM pH INTERMEDIÁRIO (5,5) COM RELAÇÃO AO pH ÓTIMO DE CADA ENZIMA DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (0,1%) POR 1 h A 60°C .

Uma vez definido o pH de trabalho, realizaram-se os estudos de termoestabilidade de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* que estão apresentados na Figura 12. Para tanto, amostras de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* foram incubadas em três temperaturas distintas (40 , 50 e 60°C) por tempos que variaram de 1 a 48 h. Ao final da incubação, as atividades foram determinadas novamente e relacionadas à atividade, em cada temperatura, das celulasas não submetidas à incubação.

Embora 60°C seja a temperatura ótima de ambas as celulasas para períodos de incubação de 1 h (ARAÚJO, 2016), foi possível observar uma perda de 80% de suas atividades relativas em 6 h para a *B/Cel9A* e em menos de 3 h para a *B/Cel9A*, o que inviabilizaria estudos cinéticos de longa duração. *B/Cel9A* foi capaz de manter 100% de sua atividade relativa a 40°C e cerca de 80% a 50°C ao longo de 48 h de incubação. Por outro lado, a *B/Cel48A* foi capaz de manter 80% de sua atividade apenas a 40°C , ao passo que perdeu 80% de sua atividade relativa quando empregada a temperatura de 50°C . Sendo assim, os estudos cinéticos posteriores foram conduzidos à temperatura de 40°C . Entretanto, é importante citar que a redução da temperatura ótima de 60°C para 40°C provoca uma perda de 60% e 50% das atividades iniciais de *B/Cel9A* e *B/Cel48A*, respectivamente.

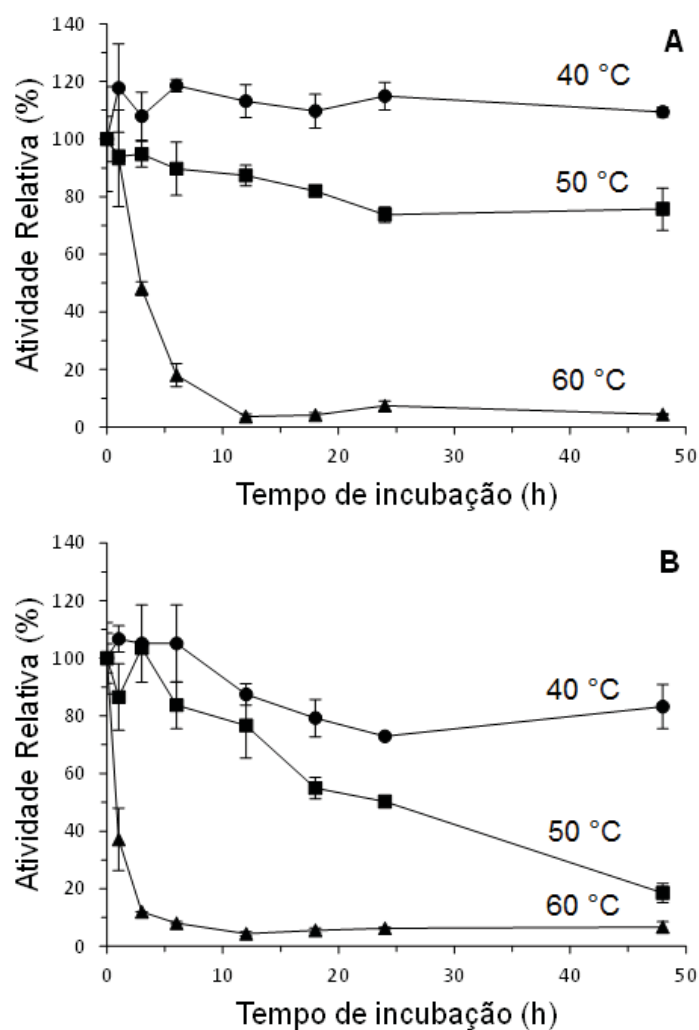


FIGURA 12 - TERMOESTABILIDADE DE *B/Cel9A* ($1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$) E *B/Cel48A* ($10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$) EXPRESSAS EM ATIVIDADE DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%) POR 1 h EM TAMPÃO CITRATO-FOSFATO (pH 5,5) APÓS DIFERENTES PERÍODOS DE INCUBAÇÃO RELACIONADAS À ATIVIDADE, EM CADA TEMPERATURA, DAS CELULASES NÃO SUBMETIDAS À INCUBAÇÃO.

Uma vez determinadas as condições de trabalho, iniciaram-se as caracterizações do desempenho de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* sobre PASC e celulose bacteriana, conforme apresentado nas seções subsequentes.

5.4 AVALIAÇÃO DOS PERFIS HIDROLÍTICOS E GRAU DE SINERGIA EMPREGANDO PASC COMO SUBSTRATO

Os estudos de caracterização das celulasas foram inicialmente realizados sobre a hidrólise de PASC, substrato cujas enzimas apresentam maior afinidade segundo ARAÚJO (2016). Inicialmente, o efeito de diferentes concentrações de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* foi avaliado durante a hidrólise de PASC por um tempo reacional de apenas 15 min. As respectivas liberações de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) e açúcares redutores insolúveis (AR_{Insol}) durante o ensaio estão apresentadas na Figura 13.

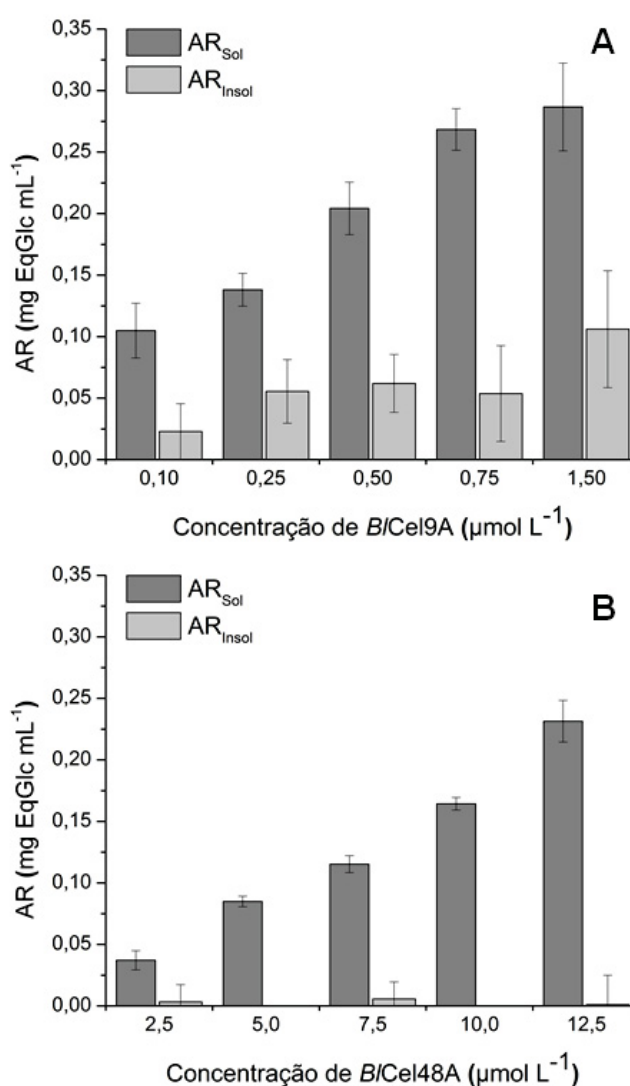


FIGURA 13 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) POR DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (A) *B/Cel9A* E (B) *B/Cel48A* DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%) POR 15 min.

Conforme observado na Figura 13, os perfis de liberação de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) e insolúveis (AR_{Insol}) corroboram a classificação proposta por ARAÚJO (2016) com base em sua estrutura molecular. A *B/Cel9A* apresenta tanto a geração de novos terminais insolúveis (AR_{Insol}) quanto a liberação de AR_{Sol} , o que a caracteriza como uma endoglucanase processiva (Figura 13A). Por outro lado, alta especificidade na liberação de produtos solúveis comprovam a *B/Cel48A* como uma enzima tipicamente exoglucanásica (Figura 13B).

A elevada susceptibilidade à hidrólise de PASC e seu grau de polimerização relativamente baixo fazem com que haja vários terminais redutores disponíveis para ação de *B/Cel48A*. Isto também justifica o fato da *B/Cel9A* apresentar liberação de AR_{Sol} como produto majoritário (71-83% do total), uma vez que o substrato já apresenta alta disponibilidade de sítios ativos para uma ação processiva.

A atividade de *B/Cel9A* foi muito superior do que a de *B/Cel48A*, tanto que, ao empregar $0,10 \mu\text{mol L}^{-1}$ dessa celulase, quantidades maiores de açúcares redutores solúveis (AR_{Sol}) e totais (AR_{Tot}) foram obtidas em comparação ao uso de $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *B/Cel48A* (carga proteica 50 vezes superior). Isto faz com que haja um aumento linear na liberação de AR_{Tot} para *B/Cel48A* em relação à quantidade de enzima empregada no ensaio, ao passo que esta cresce de forma logarítmica para *B/Cel9A* no intervalo investigado neste trabalho. Isto fica claro ao observar que o emprego de $0,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de $1,50 \mu\text{mol L}^{-1}$ resultam na mesma quantidade de AR_{Sol} liberados indicando uma saturação do substrato com estas cargas enzimáticas.

Avaliado o efeito das diferentes cargas enzimáticas sobre a hidrólise de PASC, investigou-se o efeito sinérgico da mistura de diferentes cargas de *B/Cel9A* sobre a carga de $5,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *B/Cel48A*. Os perfis de liberação de AR_{Sol} e AR_{Insol} são apresentados na Figura 14, enquanto os graus de sinergia se encontram na Figura 15.

Tanto os valores de AR_{Sol} quanto os de AR_{Insol} obtidos para as misturas com diferentes concentrações de *B/Cel9A* apresentam-se como fruto da soma das liberações individuais apresentadas na Figura 13. Tal fato faz com que os graus de sinergia apresentem valores próximos a 1, indicando ausência de efeito sinérgico entre as enzimas nestas condições tanto para a liberação de AR_{Tot} (Figura 15A) quanto para a liberação de AR_{Sol} (Figura 15B). De fato, a ausência de sinergia endo-exo é prevista para substratos amorfos e de baixo grau de polimerização, uma vez que a estrutura amorfa da celulose não apresenta impedimentos estruturais à ação

eruptiva destas enzimas e a ação exoglucanásica não é limitada pela presença de terminais de cadeia, respectivamente (WERTZ et al., 2010). Além disso, é possível que endoglucanases apresentem menor afinidade por substratos celulósicos de baixo grau de polimerização, o que reduziria a criação de novos terminais redutores e, conseqüentemente, o seu efeito sinérgico com as exoglucanases.

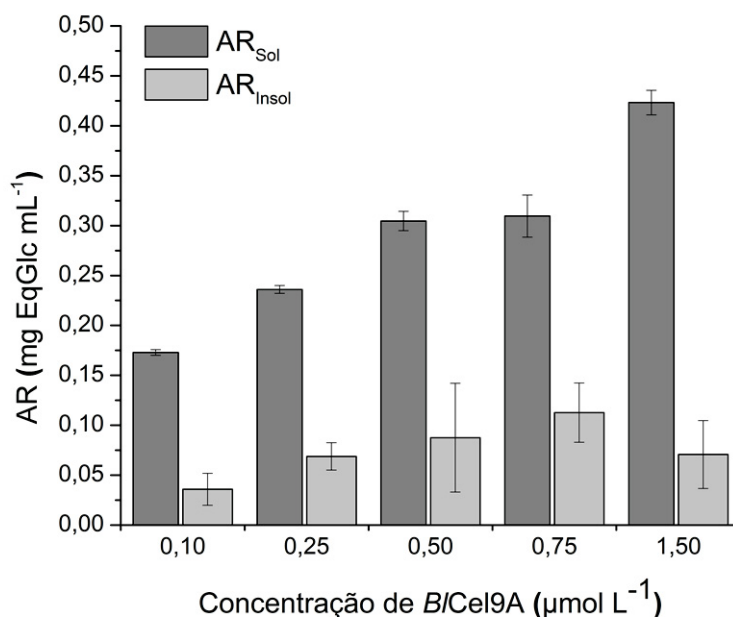


FIGURA 14 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE (15 min) DE PASC (1%) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *B/Cel9A*, QUANDO MISTURADAS A $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

Embora não tenha sido observado sinergismo entre as duas celulasas quando utilizada PASC como substrato, a menor concentração de *B/Cel9A* foi adotada para avaliar o perfil de açúcares liberados ao longo do tempo e tais resultados são apresentados na Figura 16.

Observa-se que até a primeira hora de hidrólise, a *B/Cel9A* apresenta liberação de quantidades equivalentes de AR_{Sol} e AR_{Insol} , ao passo que a partir da terceira hora de hidrólise, a liberação de AR_{Sol} começa a se sobressair, representando entre 59-67% dos AR_{Tot} ao longo do restante do ensaio. Isto se deve ao fato de que a relação entre terminais de cadeia e concentração de enzima cresce ao longo do tempo devido à ação endoglucanásica de *B/Cel9A* e a conseqüente diminuição do grau de polimerização da celulose. Sendo assim, a ação processiva a partir de um terminal já

presente na cadeia para a liberação de AR_{Sol} tende a aumentar ao longo do tempo. Por sua vez, a *B/Cel48A* apresentou novamente os AR_{Sol} como produtos majoritários de hidrólise, representando acima de 80% de AR_{Tot} em quase todos os intervalos reacionais. Por fim, o fato destas celulasas não apresentarem sinergismo durante a hidrólise de PASC faz com que o perfil de liberação seja muito semelhante à soma dos respectivos AR da ação individual de cada enzima.

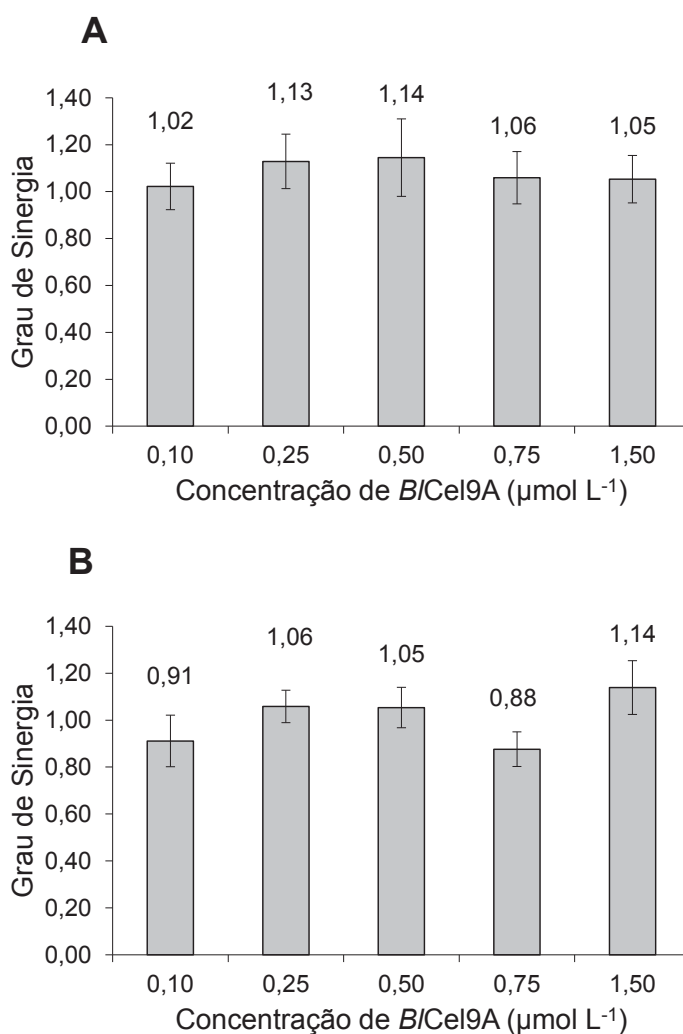


FIGURA 15 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (AR_{Tot}) E (B) AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS (AR_{Sol}) DURANTE A HIDRÓLISE (15 min) DE PASC (1%) SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *B/Cel9A*, QUANDO MISTURADAS A 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

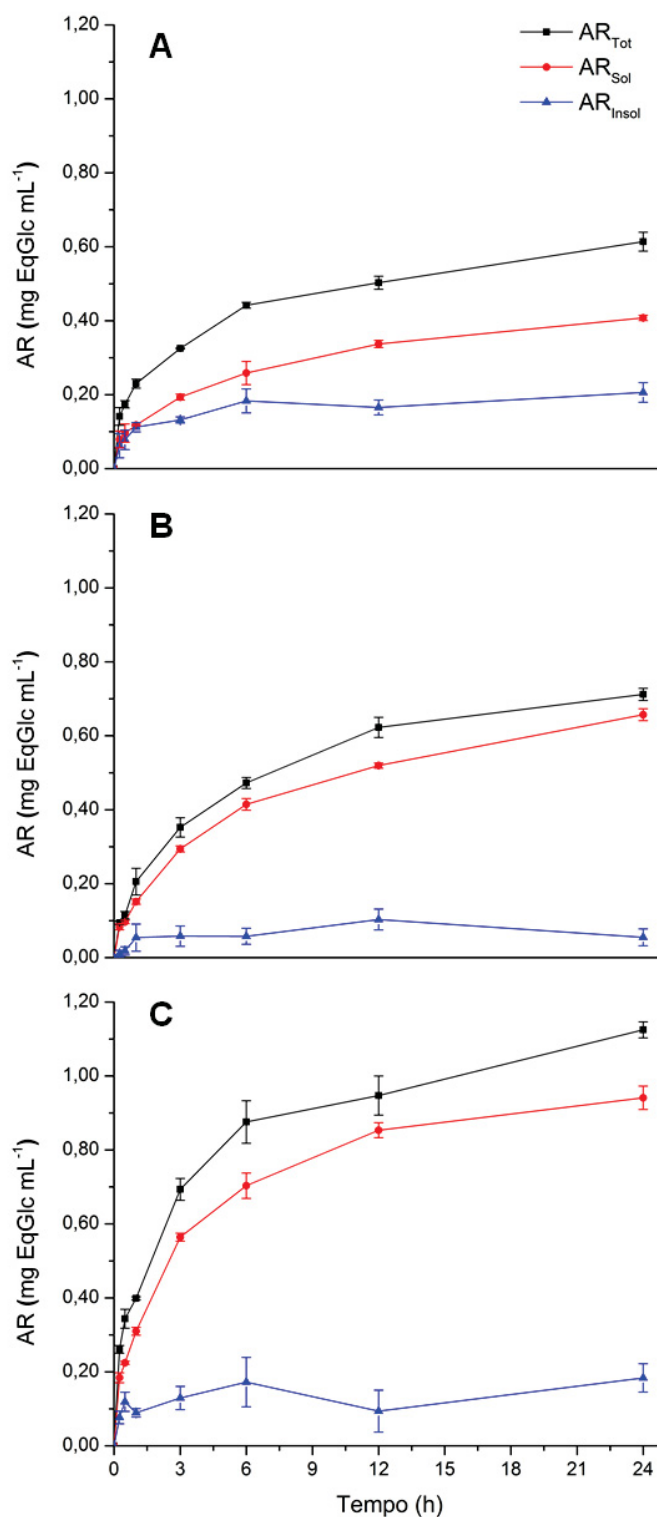


FIGURA 16 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) TOTAIS (AR_{Tot}), SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) AO LONGO DO TEMPO DURANTE A HIDRÓLISE DE PASC (1%), EMPREGANDO (A) 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel9A*, (B) 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A* E (C) UM MISTURA DE 0,10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel9A* + 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

5.5 AVALIAÇÃO DOS PERFIS HIDROLÍTICOS E GRAU DE SINERGIA EMPREGANDO CELULOSE BACTERIANA COMO SUBSTRATO

Uma vez realizada a caracterização da ação hidrolítica de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* empregando PASC como substrato, partiu-se para o uso de celulose bacteriana como substrato. De fato, estudos descritos na literatura sobre a ação destas enzimas frente à celulose bacteriana revelam algumas peculiaridades, principalmente pela capacidade das celulasas da família 9 atuarem sobre regiões cristalinas, embora prefiram regiões amorfas (CHEN et al., 2007). Tal fato as diferencia de endoglucanases típicas de *T. reesei*, que apresentam baixas atividades sobre substratos cristalinos (KIM et al., 1994).

Novamente, diferentes cargas enzimáticas foram aplicadas em um curto tempo de hidrólise. Entretanto, devido à redução de suas atividades em comparação ao uso de PASC, o tempo inicial de hidrólise foi aumentado para 60 min. Os resultados encontram-se representados na Figura 17.

Para a celulose bacteriana, a *B/Cel9A* revelou tendência em acumular maiores proporções de AR_{Insol} em relação ao observado para hidrólise de PASC, particularmente quando menores cargas enzimáticas foram aplicadas durante a hidrólise. Este comportamento foi atribuído ao elevado grau de polimerização da celulose bacteriana que, por consequência, apresenta menor disponibilidade de terminais de cadeia disponíveis para uma atuação processiva. Desta forma, na presença de pequenas quantidades de *B/Cel9A*, a relação entre enzima e terminais de cadeia é menor; por isto, para que haja uma ação processiva, a enzima necessita de uma maior difusão sob a superfície da celulose favorecendo a ocorrência de ações endoglucanásicas durante esta difusão. Em contrapartida, quando a carga enzimática é aumentada, a relação entre enzima e terminal de cadeia é superior. Por consequência, uma menor difusão é requerida até um terminal disponível para uma ação unicamente processiva, cujo resultado é uma maior liberação de AR_{Sol} em relação a AR_{Insol} . Por sua vez, a *B/Cel48A* novamente apresentou liberação majoritária de AR_{Sol} , caracterizando o comportamento exoglucanásico já observado em outros experimentos.

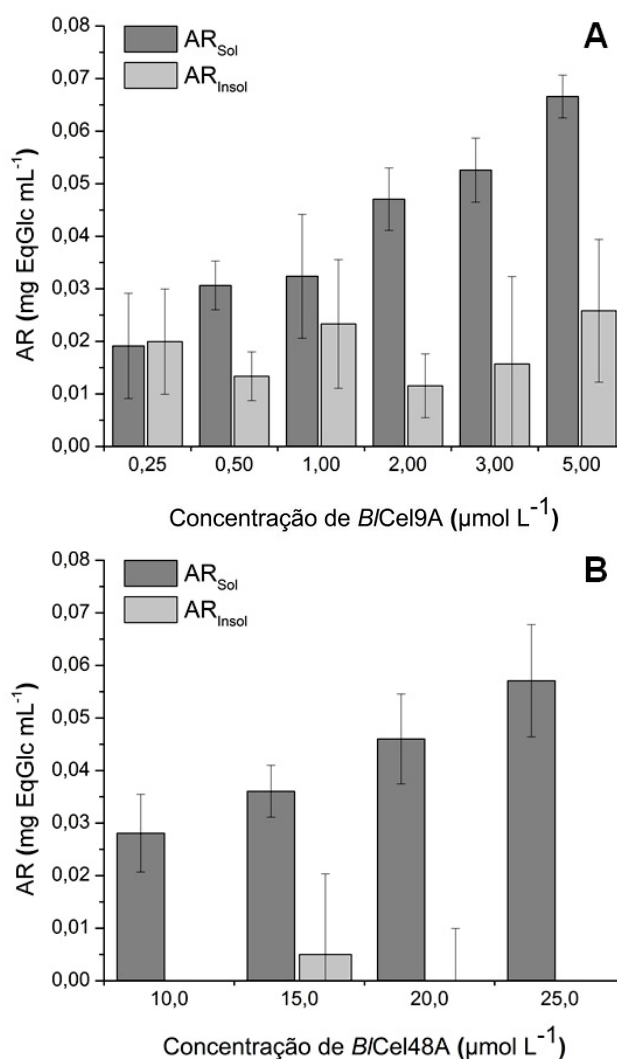


FIGURA 17 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (A) *B/Cel9A* E (B) *B/Cel48A*.

Embora ambas enzimas estudadas neste trabalho apresentem a celulose bacteriana como segundo substrato em que são mais ativas (ARAÚJO, 2016), é evidente a drástica redução na liberação de açúcares redutores (na ordem de aproximadamente 5 vezes) quando comparadas à sua atuação sobre a PASC. Tal fato é associado à elevada recalcitrância da celulose bacteriana, sobretudo em relação ao seu arranjo estrutural e, conseqüentemente, à sua cristalinidade. CHEN et al. (2007) afirmou que as celulasas da família 9 preferem atuar em regiões amorfas do substrato, embora também sejam capazes de catalisar a hidrólise em regiões

cristalinas. Baixas atividades de celulasas da família 48 sobre celulose bacteriana também têm sido relatadas (IRWIN et al., 2000; KOSTYLEV e WILSON, 2012; KOSTYLEV e WILSON, 2014). Desta forma, tratando-se de um substrato mais complexo, a atuação conjunta destas celulasas, caracterizada pelo efeito sinérgico do tipo endo-exo, parece ser indispensável para a hidrólise efetiva deste tipo de material.

A partir desses resultados, o efeito da mistura de diferentes concentrações de *B/Cel9A* em $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *B/Cel48A* foi avaliado sobre os perfis de liberação de AR_{Sol} e AR_{Insol} (Figura 18) e sobre o grau de sinergia entre as enzimas (Figura 19).

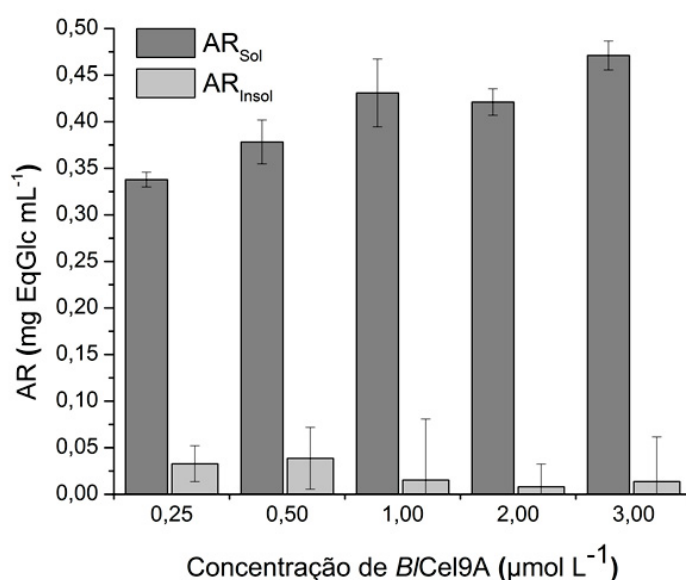


FIGURA 18 - LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *B/Cel9A* SOBRE $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

Como observado na Figura 18, as quantidades de AR_{Insol} permaneceram semelhantes às apresentadas pela maioria das cargas de *B/Cel9A* utilizadas isoladamente (Figura 17). Todavia, as misturas de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* apresentaram, em todos os casos, participações de AR_{Sol} superiores a 90% em relação ao AR_{Tot} e superiores a 96% quando utilizadas cargas de *B/Cel9A* acima de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. É evidente o efeito sinérgico estabelecido entre *B/Cel9A* e *B/Cel48A* uma vez que a liberação de açúcares redutores totais foi muito superior às liberações individuais de

cada uma. Desta forma, os graus de sinergia foram calculados e esses estão apresentados na Figura 19.

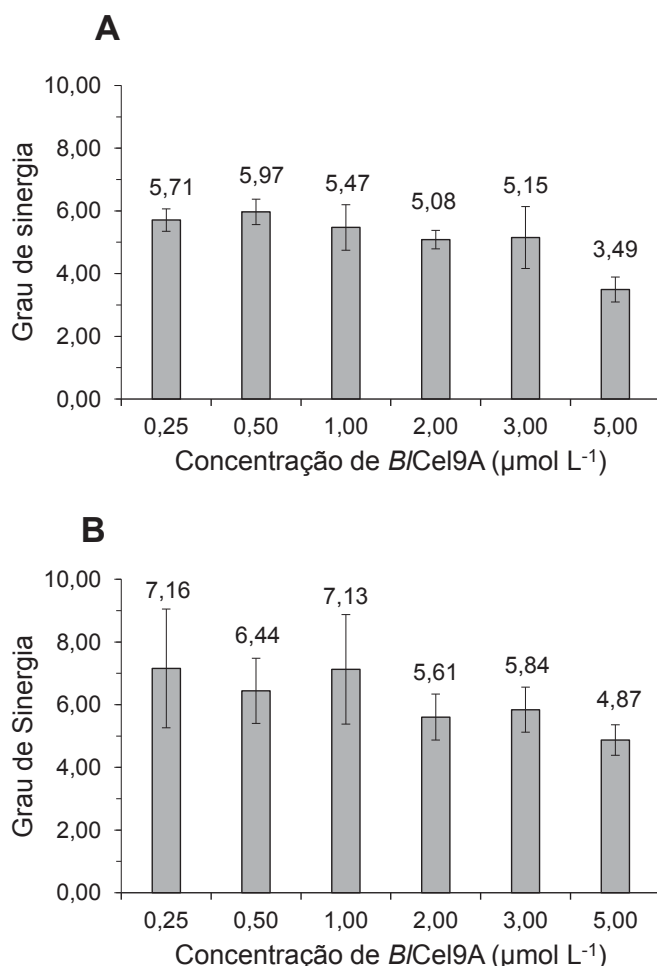


FIGURA 19 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS (AR_{Tot}) E (B) AÇÚCARES REDUTORES SOLÚVEIS (AR_{Sol}) DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR 60 min, EMPREGANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *B/Cel9A* SOBRE $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

Elevados graus de sinergia (Figura 19) foram obtidos tanto para liberação de AR_{Tot} quanto para AR_{Sol} . Devido ao alto grau de polimerização apresentado por este substrato, a ação de *B/Cel48A* é restrita aos poucos terminais de cadeia já disponíveis. Além disto, é sabido que exoglucanases de família 48 apresentam baixa atividade sobre substratos cristalinos como celulose bacteriana (IRWIN et al., 2000). Embora *Cel48A* seja uma exoglucanase, tal como *Cel7A* de *T. reesei*, apenas *TrCel7A* é capaz

de digerir completamente alguns substratos cristalinos (KOSTYLEV e WILSON, 2012).

Embora ainda não estejam totalmente elucidadas as diferenças entre os efeitos sinérgicos de Cel48A e TrCel7A com outras endoglucanases, endoglucanases processivas e exoglucanases que atuam sobre os terminais não-redutores, algumas propostas têm sido elaboradas e divulgadas na literatura.

KOSTYLEV e WILSON (2014) propuseram um modelo de sinergismo estabelecido entre Cel9A e Cel48A de *Thermobifida fusca* (TfCel9A e TfCel48A, respectivamente) durante a hidrólise de celulose bacteriana. Eles observaram que a conversão da celulose bacteriana por TfCel48A era maior quando o substrato foi previamente tratado com TfCel9A, mas que o inverso não apresentava resultado análogo. Por outro lado, quando a celulose bacteriana (já inicialmente hidrolisada por TfCel9A) era submetida a uma hidrólise com TfCel48A, um aumento da taxa de reação era observada durante a hidrólise do material residual com TfCel9A, comparativamente ao substrato que não havia sofrido o tratamento com TfCel48A. Isto demonstrou que a estrutura relativamente plana do CBM3c de TfCel9A é mais eficiente em substrato com superfície uniforme. Desta forma, a TfCel9A agiria inicialmente de forma erosiva, proporcionando a formação de sítios específicos para a ação de TfCel48A que, por sua vez, hidrolisaria as cadeias agora mais acessíveis, deixando a superfície da fibra novamente uniforme para ação de TfCel9A.

Embora as diferenças entre os graus de sinergia tenham sido muito pequenas, é notável uma leve tendência de redução com o aumento da carga de B/Cel9A. Além disto, como observado na Figura 18, o aumento da carga de B/Cel9A não apresenta influência sobre a obtenção de maiores liberações de AR_{Tot} . Portanto, conclui-se que pequenas quantidades de B/Cel9A já seriam suficientes para compor um efeito sinérgico que promovesse um aumento substancial da liberação de açúcares solúveis por esta carga de B/Cel48A. Sendo assim, para a avaliação subsequente dos perfis de liberação de AR_{Tot} , AR_{Sol} e AR_{Insol} ao longo do tempo (Figura 20), foi selecionada a menor carga de B/Cel9A avaliada neste estudo. A Figura 21 apresenta os graus de sinergia derivados desses experimentos.

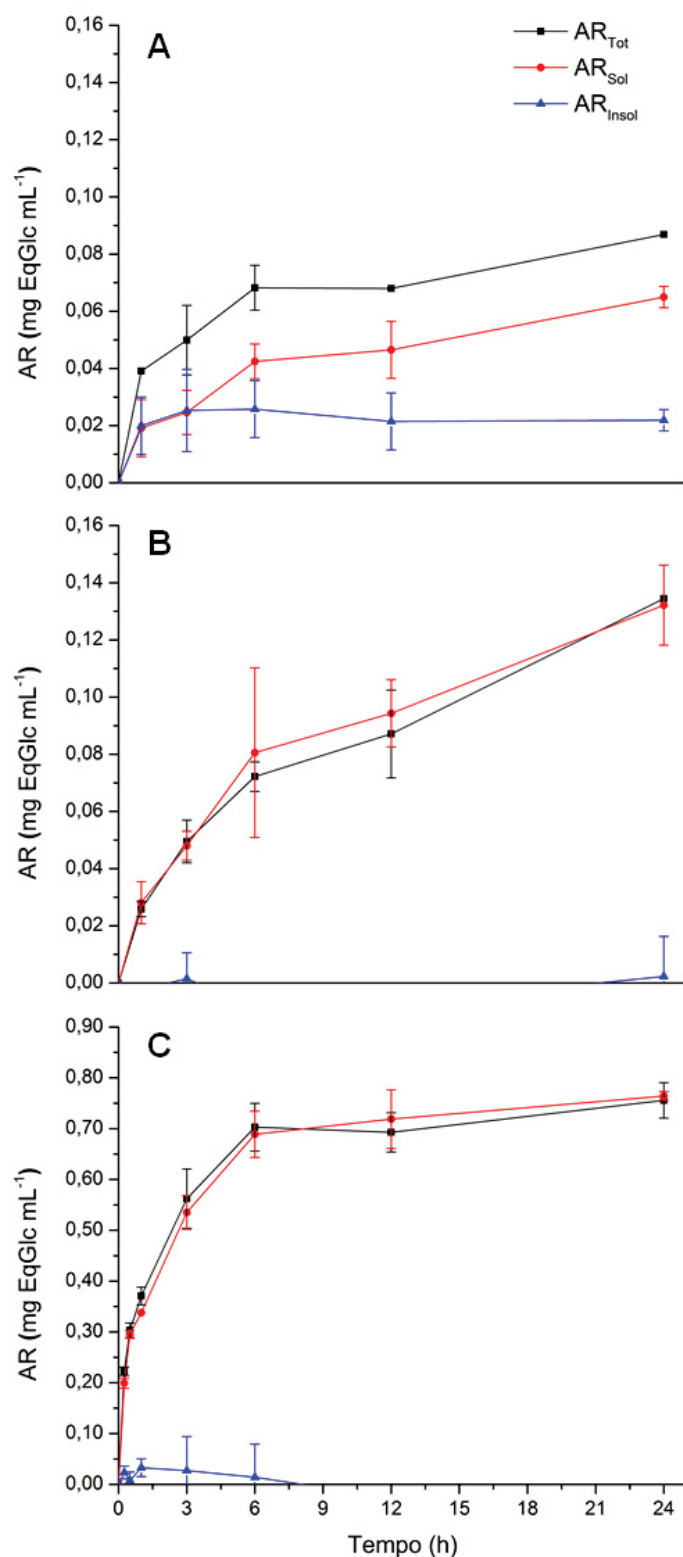


FIGURA 20 - PERFIS DE LIBERAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES (AR) TOTAIS (AR_{Tot}), SOLÚVEIS (AR_{Sol}) E INSOLÚVEIS (AR_{Insol}) AO LONGO DO TEMPO DURANTE A HIDRÓLISE DE CELULOSE BACTERIANA (1%) EMPREGANDO: (A) 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel9A*; (B) 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A* E (C) UMA MISTURA DE 0,25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel9A* + 10,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

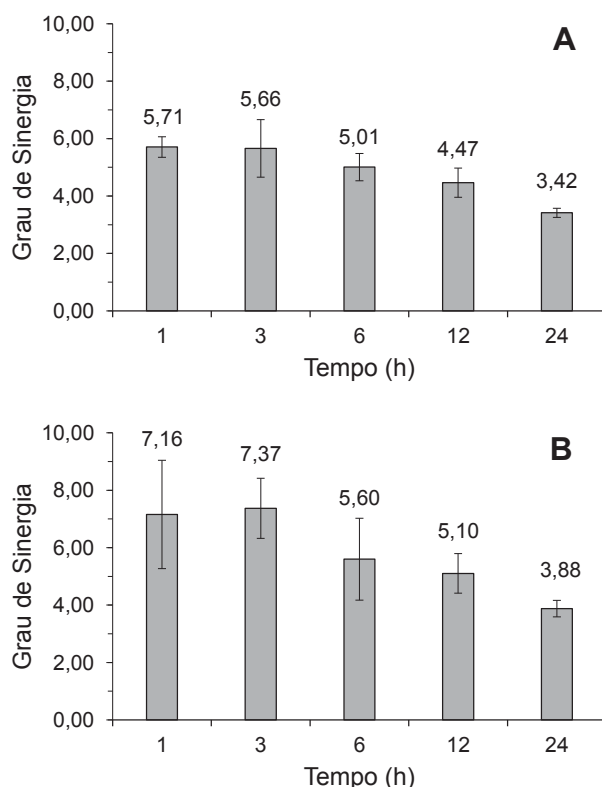


FIGURA 21 - GRAUS DE SINERGIA OBTIDOS PARA A LIBERAÇÃO DE (A) AR_{Tot} E (B) AR_{Sol} DURANTE A HIDRÓLISE (60 min) DE CELULOSE BACTERIANA (1%) POR UMA MISTURA DE $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel9A* + $10,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ DE *B/Cel48A*.

Como observado na Figura 20, a *B/Cel9A* apresenta uma liberação equivalente de AR_{Sol} e AR_{Insol} até as 3 primeiras horas de hidrólise devido à baixa disponibilidade de terminais de cadeia na estrutura do substrato. Não obstante, na medida em que o grau de polimerização é reduzido de acordo com a ação endoglucanásica de *B/Cel9A*, novas terminações de cadeia são produzidas, aumentando a probabilidade de a mesma agir processivamente a partir de um terminal já presente no substrato. Portanto, tempos reacionais mais longos levaram a um aumento na proporção de AR_{Sol} perante AR_{Tot} . Por sua vez, a *B/Cel48A* e a mistura de *B/Cel9A* + *B/Cel4* mantiveram uma liberação quase exclusiva de AR_{Sol} .

A ação complementar de *B/Cel9A* e *B/Cel48* apresentou elevados graus de sinergia conforme demonstrado na Figura 21 tanto para AR_{Tot} quanto AR_{Sol} . Entretanto, considerando que as quantidades de AR_{Insol} produzidos por *B/Cel9A* correspondem de 25 a 50% de AR_{Tot} , esses contribuíram significativamente para que os graus de sinergia calculados para AR_{Tot} sejam inferiores aos calculados apenas para a liberação de AR_{Sol} . Por fim, é notável uma redução nos graus de sinergia ao

longo do tempo. Isto se deve ao fato de que a mistura *B/Cel9A* + *B/Cel48A* atinge mais rapidamente uma fase estacionária de produção de açúcares quando comparada à ação individual de cada uma das enzimas. Desta forma, a produção de açúcares pela mistura se mantém constante a partir de 6 h, ao passo que a produção individual de cada uma continua a crescer.

Com base nos resultados obtidos, é possível observar a complementariedade da ação de *B/Cel9A* e *B/Cel48A* na sacarificação da celulose. Todavia, ainda ser faz necessário o estudo destas enzimas frente a substratos lignocelulósicos reais, os quais são empregados industrialmente. Além disto, sugere-se estudos de sinergismos destas celulasas com complexos enzimáticos comerciais, avaliando assim seu potencial de incorporação nestes produtos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos perfis de liberação de açúcares redutores corrobora a classificação das celulasas estudadas. A *B/Cel48A* apresentou liberação quase que exclusiva de produtos solúveis, enquanto a *B/Cel9A* apresentou tanto produtos insolúveis (fruto de sua ação endoglucanásica) como produtos solúveis (fruto de sua ação processiva). As diferentes propriedades dos substratos empregados (com destaque aos diferentes graus de polimerização) proporcionaram diferentes perfis de liberação para a *B/Cel9A* tanto pela variação das cargas enzimáticas aplicadas como em função do tempo. Por fim, elevados graus de sinergia foram obtidos quando utilizado celulose bacteriana como substrato, ao passo que nenhum efeito sinérgico foi detectado quando empregada a PASC. Estudos utilizando o emprego destas enzimas frente a substratos lignocelulósicos reais, além de avaliação de efeito sinérgico com complexos enzimáticos comerciais são sugeridos.

REFERÊNCIAS

ANDRIĆ, P.; MEYER, A. S.; JENSEN, P. A.; DAM-JOHANSEN, K. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 308-324, 2010.

ARANTES, V. S., J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 4-15, 2010.

ARAÚJO, E. A. **Estudos das relações entre a estrutura e função de hidrolases de glicosídeos com múltiplos domínios: Em busca de enzimas mais eficientes na depolimerização de biomassa lignocelulósica**. 37 f. Relatório de Qualificação (Doutorado Ciências. Área de concentração: Física Aplicada) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

ATALLA, R. H.; VAN DER HART, D. L. Native Cellulose: A composite of two distinct crystalline forms. **Science**, v. 223, n. 283-285, p. 1984.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, n. 2, p. 858-875, 2011.

BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, n. 5, p. 551-573, 2008.

BEESEON, W. T.; PHILLIPS, C. M.; CATE, J. H. D.; MARLETTA, M. A. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 2, p. 890-892, 2012.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 72, p. 51-56, 1992.

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 106, p. 1-13, 2016.

BORASTON, Alisdair B.; BOLAM, David N.; GILBERT, Harry J.; DAVIES, Gideon J. Carbohydrate-binding modules: fine-tuning polysaccharide recognition. **Biochemical Journal**, v. 382, n. 3, p. 769-781, 2004.

BROTMAN, Y.; BRIFF, E.; VITERBO, A.; CHET, I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. **Plant Physiology**, v. 147, n. 2, p. 779-789, 2008.

CAMILO, C. M.; POLIKARPOV, I. High-throughput cloning, expression and purification of glycoside hydrolases using Ligation-Independent Cloning (LIC). **Protein Expression and Purification**, v. 99, p. 35-42, 2014.

CASTRO, A. M. d.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

Carbohydrate-Binding Module family classification. Disponível em: <http://www.cazy.org/Carbohydrate-Binding-Modules>. Acesso em: Janeiro de 2017.

CHEN, Y.; STIPANOVIC, A. J.; WINTER, W. T.; WILSON, D. B.; KIM, Y.-J. Effect of digestion by pure cellulases on crystallinity and average chain length for bacterial and microcrystalline celluloses. **Cellulose**, v. 14, p. 283-293, 2007.

CHENG, Z.; YANG, R.; LIU, X. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* through utilizing acetic acid hydrolysate of bagasse as low-cost carbon source. **BioResources**, v. 12, n. 1, p. 1190-1200, 2017.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 850-861, 2005.

CRUYS-BAGGER, N.; ELMERDAHL, J.; PRAESTGAARD, E.; BORCH, K.; WESTH, P. A steady-state theory for processive cellulases. **FEBS Journal**, v. 280, n. 16, p. 3952-3961, 2013.

Glycoside Hydrolase Family 48. Disponível em: CAZypedia: <http://www.cazy.org/GH48>. Acesso em: Janeiro de 2017.

DAVIES, G.; HENRISSAT, B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 853-859, 1995.

DENG, W.; WANG, Y.; YAN, N. Production from organic acids from biomass resources. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 2; p. 54-58, 2016.

DIMAROGONA, M.; TOPAKAS, E.; CHRISTAKOPOULOS, P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 19, p. 8455-8465, 2013.

FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. **Cellulose hydrolysis**. New York: Springer-Verlag, 1987.

FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, p. 177-179, 1980.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERRER, M.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M.; BARGIELA, R.; STREIT, W. R.; GOLYSHINA, O. V.; GOLYSHIN, P. N. Estimating the success of enzyme bioprospecting through metagenomics: current status and future trends. **Microbial Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 22-34, 2016.

FOCKINK, D. H.; URIO, M. B.; CHIARELLO, L. M.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Principles and Challenges Involved in the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials at High Total Solids. In: SOCCOL, R. C., BRAR, K. S., FAULDS, C. e RAMOS, L. P. **Green Fuels Technology: Biofuels**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 147-173.

FUSHINOBU, S. Metalloproteins: A new face for biomass breakdown. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 88-89, 2014.

GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H.; FAN, L. T. Structural modification of lignocellulosics by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 157-172, 1983.

GUILLÉN, D.; SÁNCHEZ, S.; RODRÍGUEZ-SANOJA, R. Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 5, p. 1241-1249, 2010.

GURGEL, L. V. A. **Mercerização e modificação química de celulose e bagaço de cana-de-açúcar com anidrido succínico e trietilenotetramina: Preparação de novos materiais quelantes para a adsorção de Pb (II), Cd (II), Cr (II) e Cu (II)**. 203 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

HALLAC, B. B.; RAGAUSKAS, A. J. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 2, p. 215-225, 2011.

HARRIS, P. V.; WELNER, D.; MCFARLAND, K. C.; RE, E.; NAVARRO POULSEN, J.-C.; BROWN, K.; SALBO, R.; DING, H.; VLASENKO, E.; MERINO, S.; XU, F.; CHERRY, J.; LARSEN, S.; LO LEGGIO, L. Stimulation of Lignocellulosic Biomass Hydrolysis by Proteins of Glycoside Hydrolase Family 61: Structure and Function of a Large, Enigmatic Family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010.

HARRIS, P. V.; XU, F.; KREEL, N. E.; KANG, C.; FUKUYAMA, S. New enzyme insights drive advances in commercial ethanol production. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 19, p. 162-170, 2014.

HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**, v. 425, n. 2, p. 352-354, 1998.

IRWIN, D. C.; SPEZIO, M.; WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, n. 8, p. 1002-1013, 1993.

IRWIN, D. C.; ZHANG, S.; WILSON, D. B. Cloning, expression and characterization of a Family 48 exocellulase, Cel48A, from *Thermobifida fusca*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4988-4997, 2000.

KESHK, S. M. Bacterial cellulose production and its industrial applications. **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2014.

KESHK, S. M. A. S.; SAMESHIMA, K. Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 478-482, 2005.

KIM, D.-M.; NAKAZAWA, H.; UMETSU, M.; MATSUYAMA, T.; ISHIDA, N.; IKEUCHI, A.; TAKAHASHI, H.; ASANO, R.; KUMAGAI, I. A nanocluster design for the construction of artificial cellulosomes. **Catalysis Science & Technology**, v. 2, n. 3, p. 499-503, 2012.

KIM, D. W.; JEONG, Y. K.; JANG, Y. H.; LEE, J. K. Purification and characterization of endoglucanase and exoglucanase components from *Trichoderma viride*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 77, n. 4, p. 363-369, 1994.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; OLESKOWICZ-POPIEL, P.; SIMMONS, B.; BLANCH, H. W. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnol Bioeng**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H. P.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **ChemInform**, v. 36, p. 36, 2005.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. A distinct model of synergism between a processive endocellulase (TfCel9A) and an exocellulase (TfCel48A) from *Thermobifida fusca*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 339-344, 2014.

KOSTYLEV, M.; WILSON, D. Synergistic interactions in cellulose hydrolysis. **Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 61-70, 2012.

KROON-BATENBURG, L. M. J.; BOUMA, B.; KROON, J. Stability of cellulose structures studied by MD simulations. Could mercerized cellulose II be parallel? **Macromolecules**, v. 29, n. 17, p. 5695-5699, 1996.

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 1, p. 133-140, 2016.

MANDELS, M.; REESE, E. T. Fungal cellulases and the microbial decomposition of cellulosic fabric. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 5, p. 5-20, 1964.

MAURER, R. J.; SAX, A. F.; RIBITSCH, V. Molecular simulation of surface reorganization and wetting in crystalline cellulose I and II. **Cellulose**, v. 20, n. 1, p. 25-42, 2013.

MARQUES, C.; TAREK, R.; SARA, M.; BRAR, S. K. Sorbitol Production From Biomass and Its Global Market. In: BRAR, S. K.; SARMA, S. J.; PAKSHIRAJAN, K. (Ed.). **Platform Chemical Biorefinery**. Elsevier, 2016. p. 217-227.

MCQUEEN-MASON, S.; DURACHKO, D. M.; COSGROVE, D. J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. **The Plant Cell**, v. 4, n. 11, p. 1425-1433, 1992.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P.; CHANZY, H. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 9074-9082, 2002.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v. 33, p. 1549-1558, 2010.

PARK, S.; BAKER, J. O.; HIMMEL, M. E.; PARILLA, P. A.; JOHNSON, D. K. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2010.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; BECKHAM, G. T. Fungal Cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, 2015.

PENTTILÄ, P. A.; VÁRNAI, A.; LEPPÄNEN, K.; PEURA, M.; KALLONEN, A.; JÄÄSKELÄINEN, P.; LUCENIUS, J.; RUOKOLAINEN, J.; SIIKA-AHO, M.; VIIKARI, L.; SERIMAA, R. Changes in submicrometer structure of enzymatically hydrolyzed microcrystalline cellulose. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 1111-1117, 2010.

PINKERT, A.; MARSH, K. N.; PANG, S.; STAIGER, M. P. Ionic liquids and their interaction with cellulose. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 12, p. 6712-6728, 2009.

PITARELO, A. P. **Produção de etanol celulósico a partir do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor**. 162 f. (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, p. 863-871, 2003.

REESE, E. T. Enzymatic Hydrolysis of Cellulose. **Applied Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 39-45, 1956.

ROSSETO, F. R. **Caracterização bioquímica, biofísica e estrutural da principal endoglucanase secretada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ATCC33913**. 94 f. (Mestrado em Física) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SADDLER, J. N. Biotechnology for the conversion of lignocellulosics. **Biomass and Bioenergy**, v. 2, n. 1, p. 229-238, 1992.

SADDLER, J. N.; BROWNELL, H. H.; CLERMONT, L. P.; LEVITIN, N. Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fractions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, p. 1389-1402, 1982.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337-353, 2015.

SAKON, J.; IRWIN, D.; WILSON, D. B.; KARPLUS, P. A. Structure and mechanism of endo/exocellulase E4 from *Thermomonospora fusca*. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 4, n. 10, p. 810-818, 1997.

SALOHEIMO, M.; PALOHEIMO, M.; HAKOLA, S.; PERE, J.; SWANSON, B.; NYSSÖNEN, E.; BHATIA, A.; WARD, M.; PENTTILÄ, M. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 17, p. 4202-4211, 2002.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SEGAL, L.; CREELY, J. J.; MARTIN JR, A. E.; CONRAD, C. M. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. **Textile Research Journal**, v. 29, n. 10, p. 786-794, 1959.

SILVEIRA, M. H. L. **Pré-tratamento de bagaço de cana com CO₂ supercrítico na presença de etanol e líquido iônico: Pré-otimização das variáveis do processo e avaliação da acessibilidade dos substratos produzidos**. 131 f. Tese (Doutorado Química) - Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SILVEIRA, M. H. L.; RAU, M.; PINTO DA SILVA BON, E.; ANDREAUS, J. A simple and fast method for the determination of endo- and exo-cellulase activity in cellulase preparations using filter paper. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 5, p. 280-285, 2012.

SILVEIRA, M. H. L.; SIIKA-AHO, M.; KRUUS, K.; GARRIGA, L. M.; RAMOS, L. P. The essential role of plant cell wall degrading enzymes in the success of biorefineries: Current status and future challenges. In: DA SILVA, S. S. e CHANDEL, K. A. **Biofuels in Brazil: Fundamental aspects, recent developments, and future perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2014. p. 151-172.

SIMMONS, E. G. Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species. In: **2nd International Mycological Congress**. Tampa: University of South Florida, 1977. p. 618.

SPANO, L. A.; MEDEIROS, J.; MANDELS, M. Enzymatic hydrolysis of cellulosic wastes to glucose. **Resource Recovery and Conservation**, v. 1, n. 3, p. 279-294, 1976.

STROBIN, G.; WLOCHOWICZ, A.; CIECHANSKA, D.; BORYNIEC, S.; STRUSZCZYK, H.; SOBCZAK, S. GPC studies on bacterial cellulose. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 53, n. 10, p. 889-900, 2004.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207-234, 2005.

SUKHARNIKOV, L. O.; ALAHUHTA, M.; BRUNECKY, R.; UPADHYAY, A.; HIMMEL, M. E.; LUNIN, V. V.; ZHULIN, I. B. Sequence, structure, and evolution of cellulases in glycoside hydrolase Family 48. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41068-41077, 2012.

TEUGJAS, H.; VÄLJAMÄE, P. Product inhibition of cellulases studied with ¹⁴C-labeled cellulose substrates. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 104, 2013.

THOORENS, G.; KRIER, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; EVRARD, B. Microcrystalline cellulose, a direct compression binder in a quality by design environment—A review. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1–2, p. 64-72, 2014.

VALTASAARI, L., SAARELA, K., . Determination of chain length distribution of cellulose by gel permeation chromatography using the tricarbanilate derivate. **Paperi ja Puu**, v. 57, p. 5-10, 1975.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.; EHRENREICH, P.; BÄUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 204-211, 2004.

VIIKARI, L.; VEHMAANPERÄ, J.; KOIVULA, A. Lignocellulosic ethanol: From science to industry. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 13-24, 2012.

WADA, M.; KONDO, T.; ITOH, T. Thermally induced crystal transformation from cellulose Ia to Ib. **Polymer Journal**, v. 35, p. 115-159, 2003.

WADA, M.; NISHIYAMA, Y.; LANGAN, P. X-ray structure of ammonia-cellulose I: New insights into the conversion of cellulose I to cellulose III_I. **Macromolecules**, v. 39, n. 8, p. 2947-2952, 2006.

WALKER, L. P.; WILSON, D. B. Enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 1, p. 3-14, 1991.

WERTZ, J.-L.; BÉDUÉ, O.; MERCIER, J. P. Enzymatic hydrolysis of cellulose. In: WERTZ, J.-L., BÉDUÉ, O. e MERCIER, J. P. **Cellulose science and Technology**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 209-254.

WOOD, T. M.; MCCRAE, S. I. Synergism Between Enzymes Involved in the Solubilization of Native Cellulose. In: BROWN, R. D. e JURASEK, L. **Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis**. Washington: American Chemical Society, 1979. p. 181-209.

ZHANG, Y.-H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: Noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Determination of the number-average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1510-1515, 2005.

TRABALHOS CIENTÍFIOS PUBLICADOS

Capítulos de livro publicados

FOCKINK, D. H.; URIO, M. B.; CHIARELLO, L. M.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Principles and Challenges Involved in the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials at High Total Solids. In: R. C. Soccol, K. S. Brar, C. Faulds e L. P. Ramos. **Green Fuels Technology: Biofuels**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 147-173.

COUTURIER, M.; BENNATI-GRANIER, C.; URIO, M. B.; RAMOS, L. P.; BERRIN, J.-G. Fungal Enzymatic Degradation of Cellulose. In: R. C. Soccol, K. S. Brar, C. Faulds e L. P. Ramos. **Green Fuels Technology: Biofuels**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 133-146.

Artigos Publicados

FOCKINCK, D. H.; URIO, M. B.; SÁNCHEZ, J. H.; RAMOS, L. P. Rheological studies and fractal kinetic modeling of enzymatic hydrolysis of steam-treated sugarcane bagasse at various enzyme loadings and substrate total solids. **Energy & Fuels**, v. 31, n. 6, p. 6211-6220, 2017.